Desoxyzuckerhaltige Saccharide

Verfolgung von Biosynthesen mit Hilfe von 2-Desoxy-hexosen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der
Venia legendi
für Physiologische Chemie
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Dr. med. Werner Fischer

Konservator am Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg

1967

1967 № 232

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität
Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. Dr. phil. Friedrich May)

Desoxyzuckerhaltige Saccharide

Verfolgung von Biosynthesen mit Hilfe von 2-Desoxy-hexosen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der
Venia legendi
für Physiologische Chemie
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Dr. med. Werner Fischer

Konservator am Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

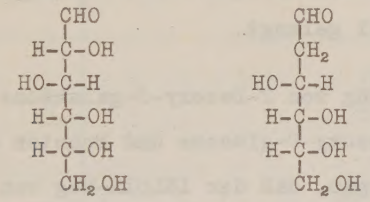
Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Ergebnisse	9
Überblick über die gefundenen desoxyzuckerhaltigen Verbindungen	9
Untersuchungen zur Strukturaufklärung der bisher rein dargestellten Verbindungen	27
1. 2-Desoxy-rohrzucker	28
2. Desoxyzuckerhaltige Glucobiosen	42
a. 2'-Desoxy-maltose	42
b. 2,2'-Didesoxy-glucobiosen	51
3. Untersuchungen an Verbindung A_2	56
4. 2-Desoxy-β-*D*-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin	58
III. Diskussion	69
IV. Zusammenfassung	84
V. Methodischer Teil	87
Pflanzenversuche	87
Extraktion der Pflanzen und Reinigung der Extrakte	88
Fraktionierung über Kohle Celite	89
Papierchromatographie	90
Dünnschichtchromatographie	93
Darstellung der desoxyzuckerhaltigen Verbindungen	95
(1) 2-Desoxy-rohrzucker	95
(2) Verbindung C_1, 2'-Desoxy-maltose	96
(3) Verbindung B_1, 2,2'-Didesoxy-glucobiose	97
(4) Verbindung B_{2a}, 2,2'-Didesoxy-glucobiose	97
(5) Verbindung A_2	97
(6) Verbindung B_3, 2-Desoxy-β-*D*-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin	98

	Seite
Strukturaufklärung	98
Säurehydrolyse zur Bestimmung der Saccharidbestandteile	99
Methoden zur quantitativen Bestimmung der Saccharidbestandteile	99
(1) 2-Desoxy-hexosen	100
(2) 2-Desoxy-*D*-glucose	101
(3) 2-Desoxy-*D*-galaktose	101
(4) *D*-Glucose	102
(5) *D*-Fructose	103
(6) Glycerin	103
Prüfung auf reduzierende Gruppen	104
(1) Verhalten gegen Alkali	104
(2) Behandlung mit Natriumborhydrid	105
Abbau durch Perjodat	105
(1) Bestimmung des Perjodatverbrauchs	105
(2) Messung von Formaldehyd	106
(3) Messung von Malonaldehyd	107
(4) Perjodatoxydation mit anschließender Reduktion durch Natriumborhydrid	108
Bestimmung der spezifischen Drehung	109
Fermentative Spaltungen	109
RAYBINsche Probe	111
VI. Literaturverzeichnis	112

Einleitung

In der Fermentchemie verwendet man zur Klärung der Substratspezifität wie auch zur Ermittlung der Haftpunkte des Substratmoleküls am Ferment substratähnliche Verbindungen, in welchen bestimmte Gruppen abgewandelt sind. Im Zuckerstoffwechsel wurde ein derartiger Versuch erstmals von E. FISCHER und seiner Arbeitsgruppe mit der durch chemische Synthese gewonnenen 2-Desoxy-*D*-glucose



D-Glucose 2-Desoxy-*D*-glucose

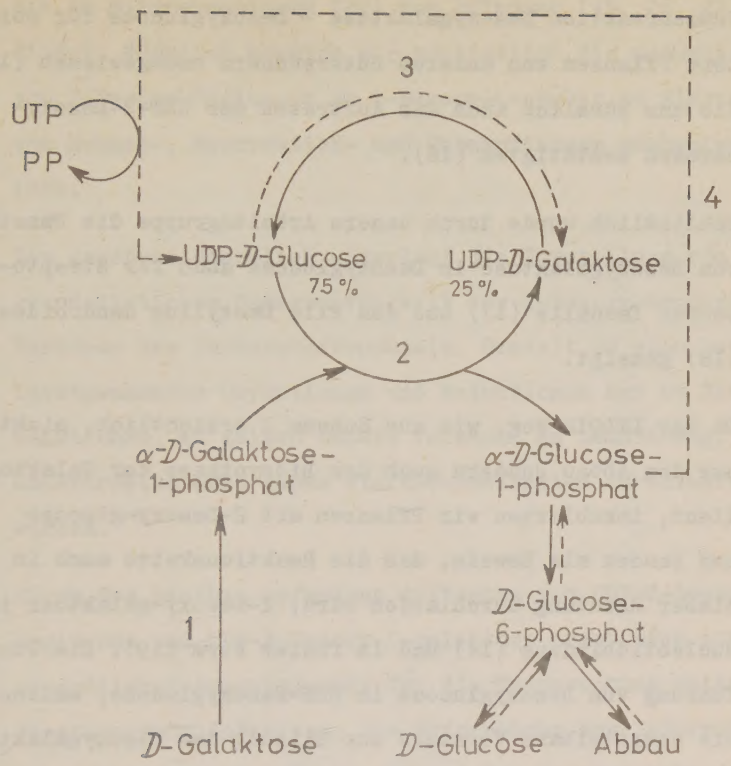
und ihren O-Methyl-glykosiden unternommen. Es konnte jedoch weder eine Umsetzung des Desoxyzuckers in Hefen noch eine Spaltung der Glykoside durch Glucosidasen gefunden werden (1, 2). Die Ansicht von der fermentativen Unangreifbarkeit der Desoxyzucker wurde erst vor wenigen Jahren zweifelhaft durch den Nachweis, daß 2-Desoxy-*D*-glucose durch die Hexokinasen aus Hirn (3), Muskel (4) und Hefen (5), 2-Desoxy-*D*-galaktose durch die Galaktokinase aus Saccharomyces fragilis (6) phosphoryliert wird. Es schien jedoch, daß 2-Desoxy-glucose-6-phosphat durch

tierische Zellen (4, 7) und Kulturhefen (8) nicht umgesetzt wird, so daß die beiden Phosphorylierungsreaktionen keine weitere Beachtung fanden.

Ausgehend von der Phosphorylierungsmöglichkeit der 2-Desoxy-*D*-galaktose griffen wir mit empfindlicheren und für 2-Desoxy-aldosen spezifischen Methoden (9, 10) die Frage nach deren Umsetzbarkeit durch die Fermente des Zuckerstoffwechsels auf. Wir prüften den LELOIR-Weg (Schema 1), der im menschlichen und tierischen Organismus (11a), in Pflanzen (11b) und zahlreichen Mikroorganismen (11c) der Umwandlung von *D*-Galaktose in *D*-Glucose dient und den Hauptweg darstellt, auf dem Galaktose in den Stoffwechsel gelangt.

Nach Verfütterung von 2-Desoxy-*D*-galaktose an Hefezellen fanden wir 2-Desoxy-*D*-glucose und konnten damit in Summenreaktion zeigen, daß der LELOIR-Weg von den Desoxyzuckern durchlaufen wird (12). Durch den Nachweis von 2-Desoxy-*D*-galaktose-1-phosphat, UDP-2-Desoxy-*D*-galaktose, UDP-2-Desoxy-*D*-glucose und 2-Desoxy-*D*-glucose-6-phosphat (13) waren die Zwischenprodukte gefaßt und damit alle Einzelschritte der Reaktionskette bewiesen (vgl. Schema 1).

Untersuchungen an Teichlinsen, Gurken-, Kürbis- und Bohnenpflanzen führten zum gleichen Ergebnis, wobei die Umwandlung der Desoxygalaktose mit allen Zwischenstufen nicht nur in sämtlichen daraufhin untersuchten Pflanzen sondern auch in den verschiedenen Pflanzenorganen nachweisbar war (14). Während unserer Versuche wurde die



Schema 1: Zum Stoffwechsel der *D*-Galaktose auf dem LELOIR-Weg. ——— Umwandlung und Abbau über *D*-Glucose, ----- Biosynthese der *D*-Galaktose. 1) Galaktokinase, 2) UDP-Glucose:α-*D*-Galaktose-1-phosphat-Uridylyltransferase, 3) UDP-Glucose-4-Epimerase, 4) UTP:α-*D*-Glucose-1-phosphat-Uridylyltransferase.

Summenreaktion Desoxygalaktose → Desoxyglucose für weitere Pflanzen von anderen Untersuchern nachgewiesen (15), die uns kürzlich auch das Auftreten der UDP-2-Desoxyhexosen bestätigten (16).

Schließlich wurde durch unsere Arbeitsgruppe die Umsetzung von Desoxygalaktose in Desoxyglucose auch für Streptococcus faecalis (17) und den Pilz Dactylium dendroides (18) gezeigt.

Da der LELOIR-Weg, wie aus Schema 1 ersichtlich, nicht nur dem Abbau sondern auch der Biosynthese der Galaktose dient, inkubierten wir Pflanzen mit 2-Desoxy-glucose und fanden als Beweis, daß die Reaktionskette auch in dieser Richtung durchlaufen wird, 2-Desoxy-galaktose in Nucleotidbindung (14) und in freier Form (19). Die Überführung von Desoxyglucose in UDP-Desoxyglucose, welche die unmittelbare Vorstufe zur Bildung der Desoxygalaktose darstellt, konnte auch an Saccharomyces cereviseae gezeigt werden (20).

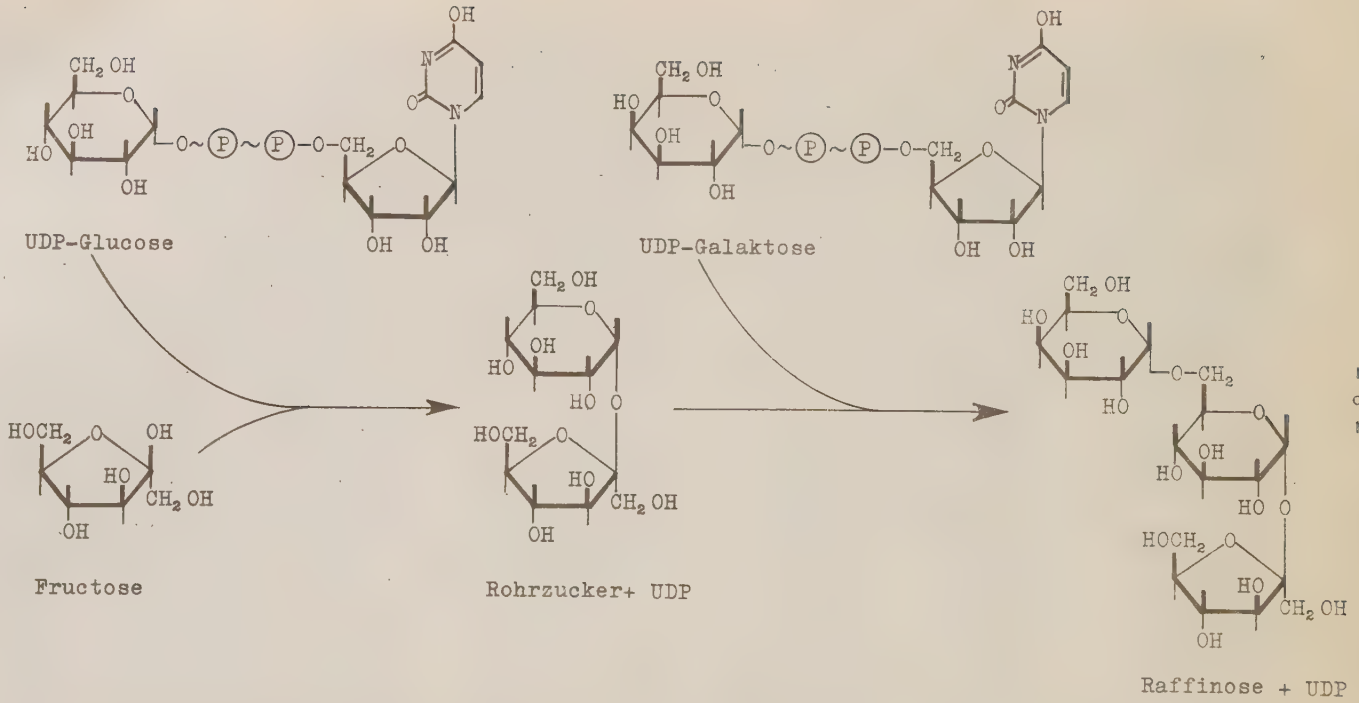
Mit der gegenseitigen Umwandlung sind die fermentativen Reaktionsmöglichkeiten noch nicht erschöpft. So wird 2-Desoxy-*D*-galaktose durch die Galaktose-Dehydrogenase bestimmter Pseudomonasarten an C-1 (21, 22), durch die Galaktose-Oxydase aus Dactylium dendroides an C-6 oxydiert (23) und 2-Desoxy-*D*-glucose durch die Glucose-Oxydase aus Penicillium notatum umgesetzt (24, 25). Eine Oxydation beider Desoxyhexosen zu den Aldonsäuren erfolgt durch weniger spezifische Aldosen-Dehydrogenasen, wie man

sie in Mikroorganismen (22) und Pflanzen (15, 26, 27) findet. Kürzlich konnten wir schließlich die Reduktion von 2-Desoxy-D-glucose zu 2-Desoxy-D-sorbit in Blättern von Bohnen-, Meerrettich- und Tabakpflanzen nachweisen (28).

Der gegebene Überblick widerlegt die Vorstellung von der grundsätzlichen Unangreifbarkeit der 2-Desoxy-hexosen durch Fermente des Zuckerstoffwechsels. Handelt es sich bei den letztgenannten Oxydationen und Reduktionen nur um Einzelreaktionen, so zeigen unsere Versuche am LELOIR-Weg, daß andererseits auch ganze Stoffwechselketten durchlaufen werden.

Durch das hierbei gefundene Auftreten von UDP-2-Desoxy-D-glucose und UDP-2-Desoxy- -galaktose ergab sich ein wesentlicher Ausgangspunkt für die Untersuchung weiterer Umsetzungsmöglichkeiten. Die Erforschung des intermediären Hexosenstoffwechsels während der letzten zehn Jahre hatte gezeigt, daß die Nucleosiddiphosphatzucker nicht nur der Umwandlung der Hexosen ineinander dienen sondern darüber hinaus die Glykosyldonatoren für die biochemischen Saccharidsynthesen darstellen (11d, 29), wobei die Bindung des Zuckers an den energiereichen Pyrophosphatrest ein für die Synthese besonders günstiges Gruppenübertragungspotential bewirkt. Ein Beispiel für eine derartige Saccharidsynthese ist in Schema 2 gegeben.

Ausgehend von dieser Funktion der Nucleosiddiphosphatzucker stellten wir uns die Frage, ob die in Nucleotidbindung gefundenen Desoxyzucker wie die normalen Hexosen



Schema 2: Raffinosebildung als Beispiel einer biochemischen Saccharidsynthese. Aus UDP-Glucose wird der Glucosylrest durch die Rohrzuckersynthetase auf Fructose übertragen (30), aus UDP-Galaktose der Galaktosylrest auf den bei der ersten Reaktion gebildeten Rohrzucker (31).

aus dem Nucleotidverband weiter reagieren und anstelle normaler Hexosen in Oligo- und Polysaccharide eingebaut werden.

BARBER hatte nach Verabfolgung von 2-Desoxy-*D*-glucose in Pflanzen bereits einige Oligosaccharide nachgewiesen, für deren Hauptkomponente die Struktur 6-O-[ß-*D*-Fructofuranosyl]-2-desoxy-*D*-glucose postuliert wurde (32). In ähnlichen Versuchen fanden KOCOUREK und Mitarbeiter ein anderes Disaccharid, das sie ohne eingehendere Strukturanalyse als 6-O-[ß-*D*-Glucopyranosyl]-2-desoxy-*D*-glucose betrachteten (15). In beiden Fällen bildet der Desoxyzucker das reduzierende Molekülende, so daß eine Desoxyhexosylübertragung aus dem Nucleotidverband für die Biosynthese postuliert wurde. Da reine desoxyzuckerfreie Disaccharide derselben Struktur in Pflanzen unbekannt sind, ist die Möglichkeit gegeben, die enzymatische Umglykosidierung durch Glycosidasen nachzuweisen, derart, daß z.B. der ß-Fructofuranosylrest aus Rohrzucker durch Invertase auf die in 2-Stellung desoxylierte Desoxyglucose übertragen wird. Orientierende Untersuchungen beider Arbeitsgruppen weisen in die gleiche Richtung. Mit der Maltosephosphorylase aus *Neisseria perflava* wurde eine ähnliche Umglykosidierung, ausgehend von Glucose-1-phosphat, direkt gezeigt (33):

ß-*D*-Glucose-1-phosphat + 2-Desoxy-*D*-glucose $\rightleftharpoons$ 4-O-[ß-*D*-Glucopyranosyl]-2-desoxy-*D*-glucose + Orthophosphat

Um die genannten Untersuchungen keine Lösung des gestellten Problems brachten, griffen wir, gestützt auf den

Nachweis der UDP-2-Desoxy-hexosen, die Frage nach der Bildung desoxyzuckerhaltiger Oligosaccharide experimentell auf. Da man im Pflanzenreich eine besondere Vielfalt an Oligosacchariden findet, wurden höhere Pflanzenarten als Versuchsobjekte gewählt. Über entsprechende Versuche wird nachfolgend berichtet. Die Ergebnisse kleinerer Vorversuche wurden bereits veröffentlicht (34, 35).

Ergebnisse

Überblick
über die gefundenen desoxyzuckerhaltigen Verbindungen

Um zu prüfen, ob 2-Desoxy-hexosen anstelle normaler Zucker in natürlich vorkommende Glykoside und Oligosaccharide eingebaut werden, wurden Pflanzen verschiedener Arten über den Blattstiel oder Triebstengel mit wäßriger Desoxyzuckerlösung gefüttert. Die durchgeführten Versuche sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Für orientierende Versuche wurden außerdem Kürbispflanzen (Cucurbito pepo) verwendet. Nach der Inkubation wurde das Pflanzenmaterial mechanisch zerkleinert, mit Äthanol extrahiert und der Extrakt von Farbstoffen, Lipiden und Salzen befreit.

In Kontrollversuchen ohne Verabfolgung von 2-Desoxy-hexosen waren in den verwendeten Pflanzen erwartungsgemäß[+)] keine desoxyzuckerhaltigen Verbindungen nachweisbar.

In Versuch 1 wurde neben den freien 2-Desoxy-hexosen im wesentlichen eine chromatographisch langsamer wandernde Verbindung gefunden (Abb. 1 und 2), die späterhin als

---

[+)] Das einzige bekannte Vorkommen von 2-Desoxy-hexosen sind die in Samen von Erysimum perofskianum gefundenen Glykoside, die 2-Desoxy-*D*-glucose und 2-Desoxy-gulose enthalten (99). 2-Desoxy-*D*-galaktose konnte bisher in natürlichen Vorkommen nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Übersicht über die durchgeführten Pflanzenversuche

Versuch Nr.	Species	Gewicht g	verwendete Pflanzenteile	Inkubationslösung Zucker	g/100ml	Dauer Stdn.	Aufnahme+) ml/100g
1	Feuerbohnen[1)]	90	junge Pflanzen ohne Wurzeln	Desoxygalaktose	0,15	29	110
2	Meerrettich[2)]	120	Blätter	Desoxyglucose	1,50	24	nicht gemessen
3	Tabak[3)]	300	Triebenden	Desoxyglucose	0,25	24	
4	Meerrettich[2)]	1600	Blätter	Desoxyglucose	0,20	47	180
5	Meerrettich[2)]	1600	Blätter	Desoxygalaktose	0,20	40	150
6	Tabak[3)]	550	Blätter (Blüten, Stengel)	Desoxyglucose	0,40	40	190
7	Gurken[4)]	750	Blätter (Blüten, Stengel)	Desoxyglucose	0,50	4	6

+) durchschnittliche Aufnahme: ml Inkubationslösung pro 100 g Pflanzenmaterial (Frischgewicht)

1) Phaseolus coccineus, 2) Armoratia rusticana, 3) Nicotiana tabacum, 4) Cucumis sativus

Abb. 1: Dünnschicht-Keilstreifenchromatogramm (System 1) des gereinigten Extraktes aus mit 2-Desoxy-*D*-galaktose inkubierten Bohnenpflanzen (Versuch 1).
1) 2-Desoxy-glucose,
2) 2-Desoxy-galaktose,
3) 2-Desoxy-rohrzucker.
Anfärbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

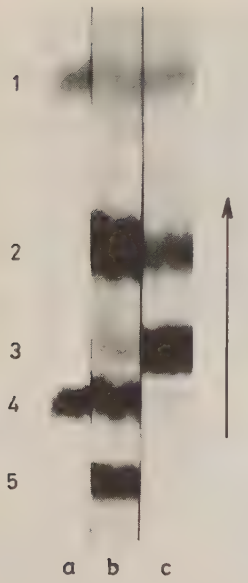


Abb. 2: Papierchromatogramm (Fließmittel a) der Zuckerbestandteile des gereinigten Extraktes aus mit 2-Desoxy-*D*-galaktose inkubierten Bohnenpflanzen (Versuch 1).
1) 2-Desoxy-hexosen, 2) Fructose, 3) Glucose, 4) 2-Desoxy-rohrzukker, 5) Rohrzucker.
Anfärbung: a) mit Perchlorsäure/Aceton auf Desoxyzucker, b) mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure auf Ketosen, c) mit Anilinphthalat.
Mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure färben sich 2, 4 und 5 tief rot, 1 oliv und 3 hellblau. Mit Anilinphthalat werden 4 und 5 bei vorsichtigem Erhitzen kaum gefärbt.

2-Desoxy-rohrzucker identifiziert wurde (34). In den Versuchen 2 und 3 ließen sich durch Fraktionierung des Pflanzenextraktes über eine Kohle-Celite-Säule bereits vier weitere desoxyzuckerhaltige Verbindungen nachweisen (35). Die mögliche Vielfalt trat jedoch erst in Versuch 4 und 5 zu Tage, wo der Einsatz von mehr Pflanzenmaterial eine weiter gehende Fraktionierung über Kohle Celite ermöglichte und daher auch in geringerer Konzentration vorliegende Verbindungen faßbar machte. Einen Überblick über die in Versuch 4 aus der Säule mit 7,5- und 15 proz. Äthanol eluierten desoxyzuckerhaltigen Verbindungen geben die Dünnschichtchromatogramme in Abb. 3 und 4, auf denen die Flecken durch die für 2-Desoxy-aldosen spezifische Chinaldinreaktion[+)] sichtbar gemacht wurden. Ähnliche Ergebnisse brachten die Versuche 5 und 6.

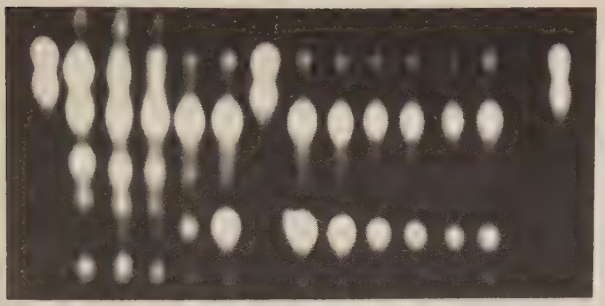
Fraktionen, die dünnschichtchromatographisch eine ähnliche Zuckerzusammensetzung erwarten ließen, wurden vereinigt (Abb. 4), weiter eingeengt und papierchromatographisch untersucht. Desoxyzuckerhaltige Verbindungen wurden durch die charakteristische Anfärbung mit Perchlorsäure/Aceton und Vanillin/Perchlorsäure sichtbar gemacht[++)]. Bei Prüfung zahlreicher Anfärbeverfahren auf Zucker fanden wir ein weiteres wertvolles Hilfsmittel im Naphthoresorcin/Phosphorsäure-Reagens, das im wesentlichen nur ketosen-

---

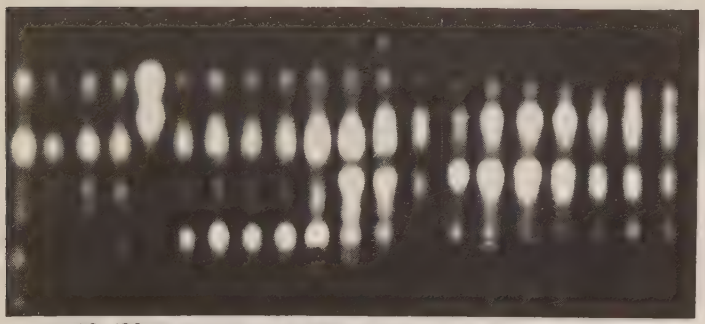
[+)] vgl. Methoden, S.94

[++)] vgl. Methoden, S.93

T 58 59 60 61 62 63 64 T 65 66 67 68 69 70 71 72



T 72 74 76 78 80 T 82 84 86 87 88 89 T



94 96 98 100 T 103 104 105 106 107 108 109 110 113 114 115 116 117 118 119

Abb. 3: Dünnschichtchromatographische Untersuchung (System 2) der aus der Kohle-Celite-Säule eluierten Fraktionen von Versuch 4. Ab Fraktion 52 wurde mit 7,5proz., ab Fraktion 101 mit 15proz. Äthanol eluiert. Die mit Wasser eluierten Fraktionen 1-52 sowie die Fraktionen 53-57 sind nicht abgebildet, da sie nur 2-Desoxy-glucose und Desoxyrohrzucker enthielten. Die Einzelfraktionen von je 250 ml wurden zur Chromatographie auf 2-4 ml eingeengt. T = Testsubstanzen: 2-Desoxy-glucose (schneller wandernd) und 2-Desoxy-galaktose. Anfärbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

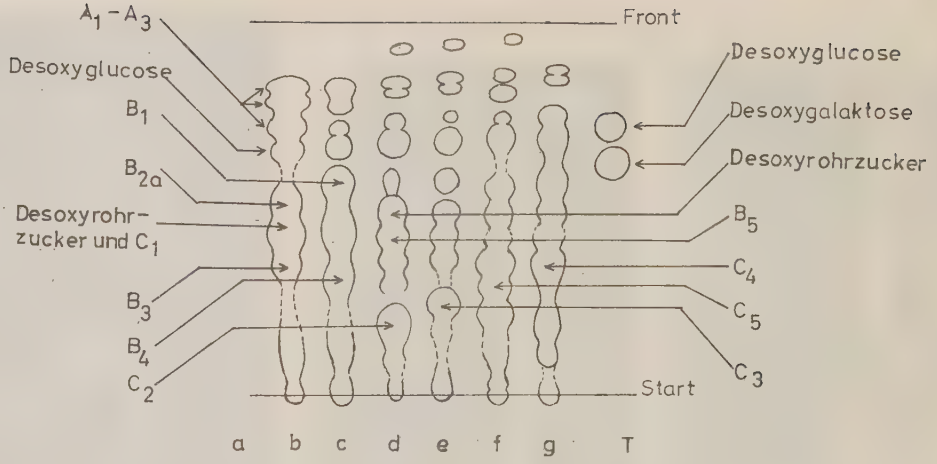


Abb. 4: Dünnschichtchromatogramm (System 4) der vereinigten Fraktionen aus Versuch 4. a) Fraktion 20-40, b) 65-67, c) 70-78, d) 79-99, e) 101-106, f) 107-112, g) 113-124, T = Testsubstanzen.

Die auf dem Dünnschichtchromatogramm versuchte Lokalisation der papierchromatographisch unterscheidbaren desoxyzuckerhaltigen Verbindungen gründet sich auf das Elutionsmuster aus der Kohle-Celite-Säule (Abb.7) und auf das dünnschichtchromatographische Verhalten späterhin isolierter Verbindungen.

und desoxyzuckerhaltige Verbindungen färbt.+) Das Reagens ermöglicht außerdem desoxyzuckerhaltige Verbindungen mit und ohne Ketose im Molekül zu unterscheiden, da sich erstere wie Fructose und Rohrzucker rot, letztere wie einfache 2-Desoxy-hexosen oliv anfärben (vgl. Abb. 5, 6).

Die Papierchromatographie ermöglichte aufgrund der größeren Laufstrecken eine weiter gehende Auftrennung und exaktere Unterscheidung der desoxyzuckerhaltigen Verbindungen als die zur Vororientierung durchgeführte Dünnschichtchromatographie. Beispiele hierfür finden sich in den nach Originalchromatogrammen gezeichneten Abb. 5 und 6.

Die bei der Papierchromatographie gewonnenen Gesamtergebnisse sind in den Tab. 2 - 5 zusammengestellt, wobei zur Orientierung die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten von Fructose, Rohrzucker und Raffinose aufgenommen sind. Entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit sind die desoxyzuckerhaltigen Verbindungen in 3 Gruppen eingeteilt. Gruppe A umfaßt die Verbindungen, die rascher als 2-Desoxy-ribose wandern; für Gruppe B liegt die Wanderungsgeschwindigkeit zwischen der von 2-Desoxy-galaktose und 2-Desoxy-rohrzucker und für Gruppe C unter der von Desoxyrohrzucker. Insgesamt lassen sich etwa 20 desoxyzuckerhaltige Verbindungen unterscheiden. Dabei ist Gruppe C noch unvollständig erfaßt, da sich in den Fraktionen 60 - 80 aus Versuch 4 und 5 bei Chromatographie mit Fließmittel a mehrere startnahe Verbindungen finden, die

---

+) Vgl. Methoden, S.93

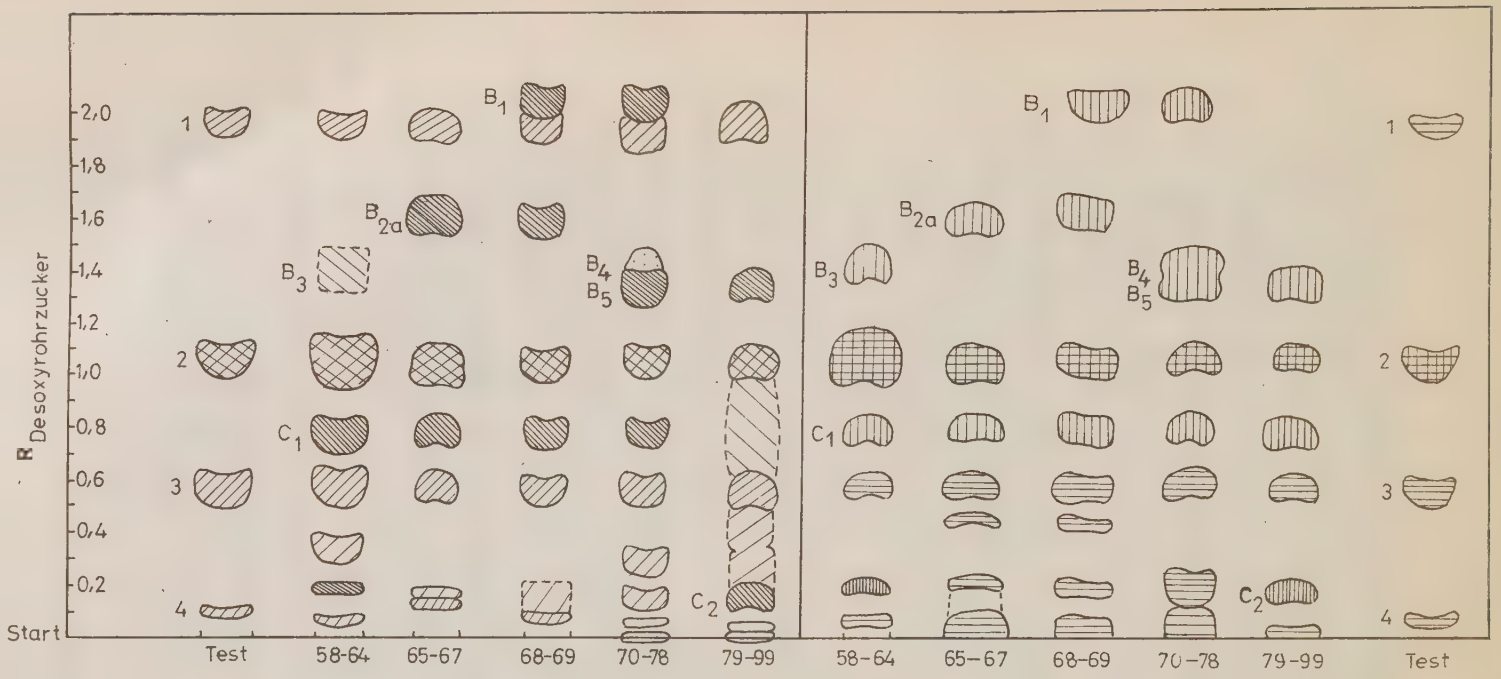


Abb. 5: Papierchromatographische Untersuchung vereinigter Fraktionen von Versuch 4. Ein Dünnschichtchromatogramm derselben Fraktionen ist in Abb. 4 wiedergegeben. Fließmittel a, Laufzeit 48 Stdn. Links Färbung mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure: oliv, rot, gelb, rot mit schwarzem Zentrum, karmesin. Rechts Färbung mit Perchlorsäure/Aceton: braun, grau, schwarzviolett. Testsubstanzen: 1 = Fructose, 2 = Desoxyrohrzucker, 3 = Rohrzucker, 4 = Raffinose

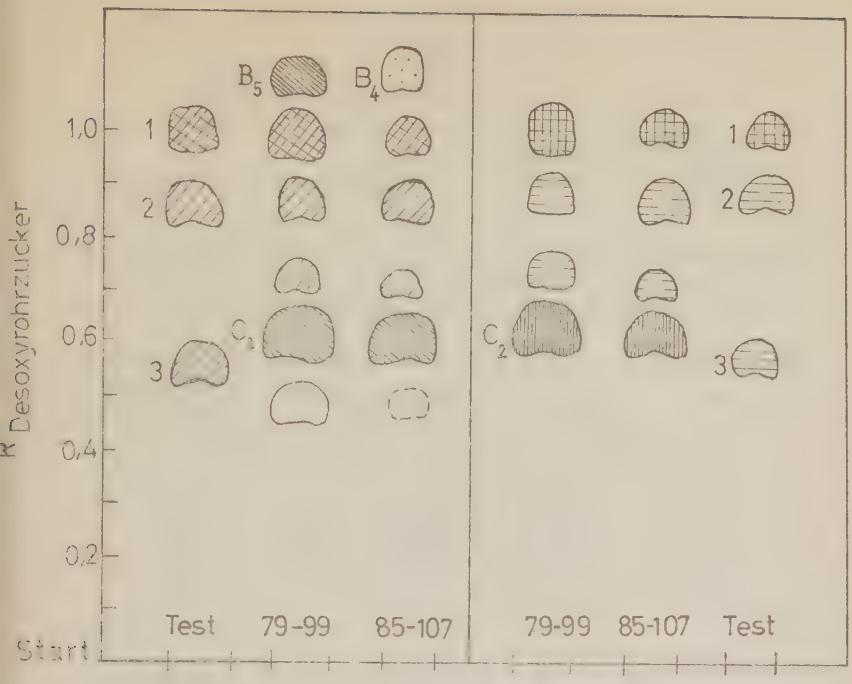


Abb. 6: Papierchromatographie der vereinigten Fraktionen 79-99 von Versuch 4 und 85-107 von Versuch 5 in Fließmittel g (Laufzeit 40 Stdn.) zum Nachweis der in Fließmittel a schlecht faßbaren Verbindung C_2 (vgl.Abb. 5). Das Chromatogramm zeigt, daß Verbindung C_2 sowohl nach Verabreichung von 2-Desoxy-glucose (Versuch 4) als auch nach Gabe von 2-Desoxy-galaktose (Versuch 5) gebildet wird. Die Verbindung aus beiden Versuchen erwies sich auch bei Papierchromatographie in den Fließmitteln c, d, e, h als identisch.

Links: Färbung mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure, rechts: mit Perchlorsäure/Aceton.

Test: 1 = Desoxyrohrzucker, 2 = Rohrzucker, 3 = Raffinose.

Links: oliv, gelb, rot mit schwarzem Zentrum, rot, karmesin.

Rechts: schwarzviolett, grau, braun.

Tabelle 2

Desoxyzuckerhaltige Verbindungen, Gruppe A

		Färbung[2]	Vorkommen Versuch Nr.
[illegible]	[illegible]	oliv	4, 5
[illegible]	[illegible]	blaugrün[3]	3 - 6
[illegible]	[illegible]	oliv	4 - 6
2-Desoxy-ribose	1,0	oliv	Testsubstanz
2-Desoxy-glucose	0,65 ± 0,03	oliv	[illegible]
2-Desoxy-galaktose	0,50 ± 0,04	oliv	Testsubstanz

1) $R_{\text{Desoxyribose}}$, Papierchromatographie in Fließmittel a Laufzeit 8 Stdn.

2) Naphthoresorcin/Phosphorsäure

3) Wodurch die abweichende Färbung bedingt ist, bleibt zu klären. Die Verbindung enthält nachweislich 2-Desoxy-glucose (vgl. S.57).

Tabelle 3

Desoxyzuckerhaltige Verbindungen, Gruppe B

Verbindung	R_{deRo} [1]	Färbung [2]	Vorkommen Versuch Nr.
2-Desoxy-glucose	3,71 ± 0,15	oliv	Testsubstanz
B_1	2,01 ± 0,03	oliv	2 - 6
Fructose	1,95 ± 0,03	rot	Testsubstanz
B_2 [3]	1,69 ± 0,05	oliv	6
B_{2a}	1,58 ± 0,02	oliv	4
B_3	1,40 ± 0,03	oliv	5,(4,6)
B_4	1,39 ± 0,03	gelb [4]	3 - 6
B_5	1,34 ± 0,01	oliv	4, (5)
B_6	1,20 ± 0,02	oliv	5
2-Desoxy-rohrzucker	1,0	rot	1 - 6
C_1	0,77 ± 0,01	oliv	2 - 6
Rohrzucker	0,56 ± 0,01	rot	1 - 6
C_2	0,15 ± 0,02	oliv	4 - 6
Raffinose	0,08 ± 0,01	rot	4,5

1) $R_{Desoxyrohrzucker}$, Papierchromatographie in Fließmittel a, Laufzeit 44-50 Stdn.

2) Naphthoresorcin/Phosphorsäure

3) B_2 ist möglicherweise mit B_{2a} identisch, da B_2 kappenförmig auf B_4 aufgelagert ist, was eine exakte Bestimmung des R_F-Wertes unmöglich macht.

4) Die Verbindung färbt sich auch mit Perchlorsäure/Aceton anfangs gelb, zeigt dann aber während des weiteren Erhitzens das für 2-Desoxy-zucker charakteristische Braun. Mit Vanillin/Perchlorsäure tritt Blauviolettfärbung auf, im langwelligen UV-Licht findet man das für 2-Desoxy-aldosen typische Rot (vgl.S.93). Für den endgültigen Nachweis einer 2-Desoxy-hexose im Molekül bleibt die Darstellung und Strukturanalyse der Verbindung abzuwarten.

Tabelle 4: Desoxyzuckerhaltige Verbindungen, Gruppe C, Teil I

Verbindung	R_{deRo} [1]		R_{Raff} [2]		Färbung [3]	Vorkommen Versuch Nr.
	FM. g	FM. h	FM. g	FM. h		
2-Desoxy-rohrzucker	1,0	1,0	1,79 ± 0,04	2,16 ± 0,09	rot	Testsubstanz
C_1	0,93 ± 0,01	-	1,70 ± 0,06	-	oliv	2 - 6
C_5	0,93 ± 0,02	0,91 ± 0,01	1,67 ± 0,04	1,93 ± 0,04	rot	4
Rohrzucker	0,86 ± 0,01	0,81 ± 0,01	1,54 ± 0,04	1,75 ± 0,04	rot	Testsubstanz
C_3	0,80 ± 0,01	0,84 ± 0,02	1,41 ± 0,04	1,85 ± 0,05	oliv	4,5
C_2	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,03	1,12 ± 0,03	1,30 ± 0,03	oliv	4 - 6
C_4	0,66 ± 0,02	0,61 ± 0,01	1,21 ± 0,02	1,30 ± 0,04	rot	4,5
Raffinose	0,56 ± 0,02	0,46 ± 0,02	1,0	1,0	rot	4,5

1) $R_{Desoxyrohrzucker}$, Papierchromatographie in Fließmittel g (48 Stdn.) und h (24 Stdn.)

2) $R_{Raffinose}$, Papierchromatographie in Fließmittel g und h (48 bzw. 24 Stdn.)

3) Naphthoresorcin/Phosphorsäure

Tabelle 5

Desoxyzuckerhaltige Verbindungen, Gruppe C, Teil II

Verbindung	R_{deRo} [1]	Färbung [2]	Vorkommen Versuch Nr.
2-Desoxy-rohrzucker	1,0	rot	Testsubstanz
Rohrzucker	0,70 ± 0,01	rot	Testsubstanz
C_2	0,45 ± 0,03	oliv	4 - 6
C_6	0,39	oliv	6
C_7	0,25	oliv	6
Raffinose	0,24	rot	Testsubstanz
C_8	0,17	oliv	6
C_9	0,11	oliv	6
C_{10}	0,07	oliv	6

1) $R_{Desoxyrohrzucker}$, Papierchromatographie in Fließmittel c, Laufzeit 72 Stdn.

2) Naphthoresorcin/Phosphorsäure

Anmerkung: Die Verbindungen C_7-C_{10} werden nur in relativ geringen Mengen gefunden.

mit geeigneteren Fließmitteln bislang nicht differenziert wurden. Ein Versuch, einen Teil der papierchromatographisch unterscheidbaren Verbindungen auf dem Dünnschichtchromatogramm zu lokalisieren, findet sich in Abb. 4.

An natürlich vorkommenden Kohlenhydraten waren in sämtlichen Versuchen Glucose, Fructose und Rohrzucker nachweisbar. Raffinose fand sich nur in Meerrettich-, nicht aber in Tabakblättern. Auf Verbindungen, die sich wie Maltose oder Melibiose mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure [illegible] anfärben, wurde mit anderen Färbeverfahren nicht geprüft.

In Abb. 7 ist das Elutionsmuster aus der Kohle-Celite-Säule für die verschiedenen Verbindungen anhand von Versuch 4 schematisch dargestellt. Ein sehr ähnliches Verhalten wurde in den Versuchen 5, 6 und 7 beobachtet. Das frühe Auftreten von Rohrzucker und Desoxyrohrzucker ist in Versuch 4, offenbar wegen Überladung der Säule, atypisch, da in sämtlichen anderen Versuchen beide Verbindungen erst mit 5- oder 7,5proz. Äthanol eluiert wurden (vgl. Abb. 8).

Man erkennt in Abb. 7, daß die Verbindungen der Gruppe A und B und die Verbindung C_1 wie die Hauptmenge von Rohrzucker und Desoxyrohrzucker mit 7,5proz. Äthanol eluiert wurden. Unter Berücksichtigung ihrer papierchromatographischen Wanderungsgeschwindigkeit(Tab. 2, 3) kann daraus geschlossen werden, daß es sich um niedermolekulare Verbindungen, wohl vorwiegend um desoxyzuckerhaltige Disaccharide handelt. Verbindung C_2, die erst in den späten

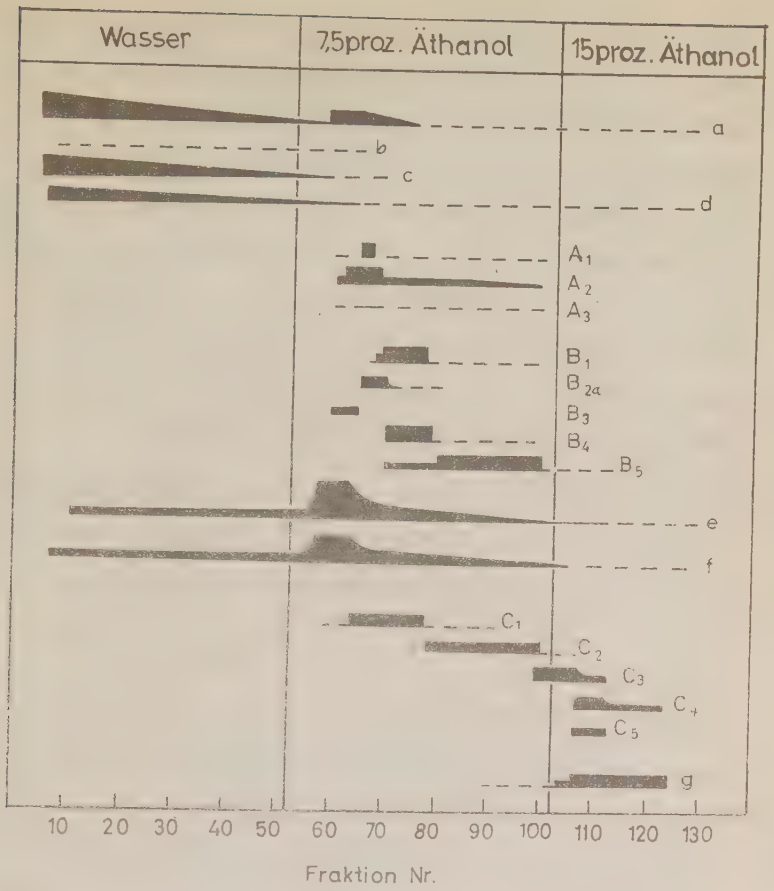


Abb. 7: Elutionsfolge der verschiedenen Verbindungen von der Kohle-Celite-Säule, nach den papierchromatographischen Ergebnissen für Versuch 4 schematisch dargestellt. Volumen der eluierten Einzelfraktion 250 ml.
a) 2-Desoxy-glucose, b) 2-Desoxy-galaktose, c) Glucose, d) Fructose, e) 2-Desoxy-rohrzucker, f) Rohrzucker, g) Raffinose. A_1 - A_3, B_1 - B_5, C_1 - C_5 = desoxyzuckerhaltige Verbindungen.

Fraktionen mit 7,5proz. Äthanol erscheint, leitet auf-grund ihrer langsamen papierchromatographischen Wanderungsgeschwindigkeit (Tab. 5) offensichtlich zu den höheren Oligosacchariden über, denen wahrscheinlich auch die übrigen Vertreter der Gruppe 3 zuzuordnen sind, zumal sie sich auf der Kohle-Celite-Säule ähnlich wie Raffinose verhalten. Die Verbindungen C_6 bis C_{11} aus Versuch 6 (Tab. 5) [illegible] papierchromatographisch noch nicht untersucht.

[illegible] Versuch 4.

[illegible] nose nicht nachweisbar ist.

Die aus der Kohle-Celite-Säule gewonnenen Fraktionen von Versuch 7 sind papierchromatographisch noch nicht untersucht. Einen vorläufigen Überblick geben die Dünnschichtchromatogramme in Abb. 8. Die desoxyzuckerhaltigen Verbindungen finden sich hier in relativ geringen Mengen, was durch das rasche Welken der in Versuch 7 verwendeten Gurkenpflanzen und die dadurch bedingte geringe Aufnahme von Desoxyglucose (vgl. Tab. 1) verursacht wurde. In den mit 2proz. Äthanol eluierten Fraktionen 10-12 erkennt man wenig oberhalb des Starts eine bislang unbekannte Verbindung. Außerdem findet man die folgenden, aus den vorausgehenden Versuchen bekannten Verbindungen:

2-Desoxy-rohrzucker ab Fraktion 13

Verbindung C_1 [+)] ab Fraktion 14

Verbindungen der Gruppe A ab Fraktion 15

Verbindung B_1 und B_4 ab Fraktion 20

Verbindung C_3 ab Fraktion 25

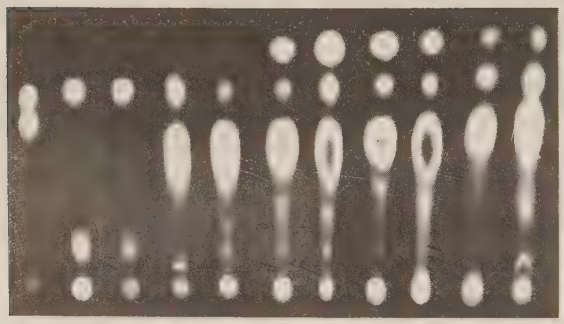
Verbindung C_4 ab Fraktion 27

Mit dem Auftreten der Verbindungen C_3 und C_4 wird eine Ähnlichkeit zum Oligosaccharidmuster der Meerrettichpflanzen wahrscheinlich.

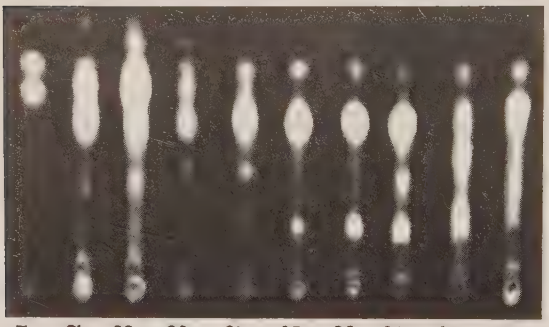
Die bisherigen Untersuchungen lassen neben speciesbedingten Unterschieden erkennen, daß bestimmte desoxyzuckerhaltige Verbindungen wie Desoxyrohrzucker, B_1, B_4, C_1 und Vertreter der Gruppe A in Meerrettich-, Tabak- und Gurkenpflanzen gebildet werden.

+) durch Spaltung des Desoxyrohrzuckers mittels Invertase sichtbar gemacht (vgl. z.B. Abb. 11).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 T



T 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



T 21 22 23 24 25 26 27 28 29

Abb. 8: Dünnschichtchromatographische Untersuchung (System 2) der aus der Kohle-Celite-Säule eluierten Fraktionen von Versuch 7. Bis Fraktion 8 wurde mit Wasser, ab Fraktion 9 mit 2-, ab Fr. 12 mit 5-, ab Fr. 17 mit 7,5- und ab Fr. 27 mit 15proz. Äthanol eluiert. Die Einzelfraktionen von 1500-2000 ml wurden zur Chromatographie auf 2-4 ml eingeengt.
T = Testsubstanzen: 2-Desoxy-glucose (schneller wandernd) und 2-Desoxy-galaktose. Anfärbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

Untersuchungen zur Strukturaufklärung der bisher rein dargestellten Verbindungen

Von den im Vorausgehenden mit Hilfe der Papierchromatographie unterschiedenen 20 desoxyzuckerhaltigen Verbindungen wurden Desoxyrohrzucker sowie die Verbindungen C_1, B_1, B_{2a}, A_2 und B_3 in chromatographisch reiner Form dargestellt.

Über Untersuchungen zur Strukturaufklärung dieser Verbindungen wird im Folgenden berichtet.

Durch die hierbei gewonnenen Ergebnisse werden die im vorausgehenden Abschnitt aus dem chromatographischen und färberischen Verhalten gezogenen Schlüsse bestätigt, da es sich bei den analysierten Verbindungen um Disaccharide oder einfache Heteroside handelt und diese sämtlich eine 2-Desoxy-hexose enthalten.

1. Desoxyrohrzucker

2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl-ß-*D*-fructofuranosid

Das Vorhandensein einer 2-Desoxy-hexose im Molekül zeigte sich an der charakteristischen Färbung mit Perchlorsäure/Aceton (Abb. 2, a), Vanillin/Perchlorsäure und dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens (Abb. 1 und 9), während die intensive Rotfärbung mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure (Abb. 2, b) als zweiten Bestandteil eine Ketose erkennen ließ. Die geringe Anfärbbarkeit mit Anilinphthalat (Abb. 2, c) sowie die ausbleibende Färbung mit alkalischer 3,5-Dinitrosalicylsäure oder 3,4-Dinitrobenzoesäure ließ ein nicht reduzierendes Saccharid erwarten.

Durch die Rotviolettfärbung der Verbindung mit Harnstoff/Phosphorsäure ist eine Unterscheidung von Rohrzucker möglich, da dieser wie einfache Ketosen blau gefärbt erscheint. Die Ursache liegt im Desoxyzuckeranteil, da sich 2-Desoxy-aldosen mit dem Reagens lila anfärben, während der Glucoseanteil im Rohrzucker nicht reagiert (vgl. S.92).

Das chromatographische Verhalten sprach für ein Disaccharid. So wird die Verbindung aus der Kohle-Celite-Säule ähnlich wie Rohrzucker eluiert, während Monosaccharide früher, Trisaccharide, wie z.B. Raffinose, später erscheinen. Bei Papierchromatographie wandert das Glykosid in sämtlichen Fließmitteln langsamer als freie 2-Desoxy-

hexosen (Abb. 2), stets aber rascher als Rohrzucker (Tab. 6) und liegt in der Regel zwischen diesem und Fructose (Abb. 2). Gesichert ist das Vorliegen eines Disaccharides durch chromatographische Verfolgung der Säurehydrolyse und fermentativen Spaltung, wobei außer der ungespaltenen Verbindung und den Monosaccharidbestandteilen keinerlei Zwischenprodukte erkennbar waren, wie sie beim Vorliegen höherer Oligosaccharide zu erwarten sind.

Zur Strukturaufklärung wurden zwei Präparate verwendet (Tab. 7 und 8). Präparat I stammt aus den mit 2-Desoxy-galaktose gefütterten Bohnenpflanzen von Versuch 1; Präparat II wurde aus den mit 2-Desoxy-glucose inkubierten Meerrettichblättern von Versuch 4 gewonnen.

Bei milder Säurehydrolyse (0,1 N HCl, 5 Min., 100°; 0,5 N HCl, 210 Min., 20°) wird das Disaccharid vollständig gespalten, wobei chromatographisch nur 2-Desoxy-glucose und Fructose nachweisbar werden. Wie aus Tab. 7 und 8 hervorgeht, liegen die beiden Bestandteile im Hydrolysat, wie bei einem Disaccharid zu erwarten, in äquimolaren Mengen vor.

Durch die Umsetzbarkeit des frei gewordenen Desoxyzuckers durch Glucose-Oxydase (Tab. 7/1) und der Ketose durch Glucose-6-phosphat-Isomerase sind die beiden Bestandteile aufgrund der strengen Substratspezifität dieser Fermente als 2-Desoxy-*D*-glucose und *D*-Fructose charakterisiert.

Tabelle 6

Papierchromatographische Wanderungsgeschwindigkeit von Desoxyrohrzucker im Vergleich zu Rohrzucker

Fließmittel	$R_{Rohrzucker}$
a	1,83 ± 0,05
b	1,43 ± 0,02
c	1,44 ± 0,02
d	1,57 ± 0,03
e	1,33 ± 0,02
f	1,17 ± 0,02
g	1,23 ± 0,04

Tabelle 7

Quantitative Untersuchungen an Präparat I

1) Hydrolyse (0,5 N HCl, 20°, 210 Min.)	
Desoxyglucose (µMol/ml)	
Thiobarbitursäuremethode	22,64
Glucose-Oxydase	22,22
Fructose (µMol/ml)	21,66
Desoxyglucose : Fructose (Mol/Mol)	1 : 0,97
2) Behandlung mit Alkali und Hydrolyse	
Desoxyglucose (µMol/ml)	21,95
Fructose (µMol/ml)	20,66
Desoxyglucose : Fructose (Mol/Mol)	1 : 0,94
3) Behandlung mit Borhydrid und Hydrolyse	
Desoxyglucose (µMol/ml)	18,15
Fructose (µMol/ml)	17,74
Desoxyglucose : Fructose (Mol/Mol)	1 : 0,98
4) Spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$	+43,9° bis +45,9°

Sämtliche Konzentrationsangaben sind auf die Ausgangslösung bezogen. Die Messung der Fructose erfolgte mittels Glucose-6-phosphat-Isomerase, Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (S.103). Die Desoxyglucose wurde, wenn nicht anders vermerkt, mit der Thiobarbitursäuremethode gemessen (S.100).

Tabelle 8

Quantitative Untersuchungen an Präparat II

1) Nicht hydrolysiert	
Desoxyglucose (µMol/ml)	307,90
2) Hydrolyse (0,1 N HCl, 100°, 5 Min.)	
Desoxyglucose (µMol/ml)	296,29
Fructose (µMol/ml)	305,72
Desoxyglucose : Fructose (Mol/Mol)	0,97 : 1
3) Hydrolyse (0,5 N HCl, 20°, 210 Min.)	
Desoxyglucose (µMol/ml)	306,90
Fructose (µMol/ml)	302,46
Desoxyglucose : Fructose (Mol/Mol)	1,01 : 1
4) Mittlere Konzentration aus 1) bis 3) berechnet (µMol/ml)	303,85
%	9,9
5) Spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$	
aus den Extremkonzentrationen in 1) und 2) berechnet	+43,9° +45,6°
aus der mittleren Konzentration berechnet	+44,5°

Sämtliche Konzentrationsangaben sind auf die Ausgangslösung bezogen. Die Messung der Desoxyglucose erfolgte mittels der Thiobarbitursäuremethode (S.100), die der Fructose wie bei Tab.7 angegeben.

Nach 45 Min. in 1 N NaOH auf dem siedenden Wasserbad[+)] zeigt das Disaccharid wie Rohrzucker und andere nicht reduzierende Oligosaccharide chromatographisch keine Veränderung und wird, im Anschluß an die Alkalibehandlung hydrolysiert, nach quantitativer Bestimmung seiner Bestandteile zu 95 - 98% wiedergefunden (Tab. 7/2). Desoxyglucose und Fructose sind unter denselben Bedingungen bereits nach 10 Min. mit den verwendeten Meßverfahren nicht mehr nachweisbar.

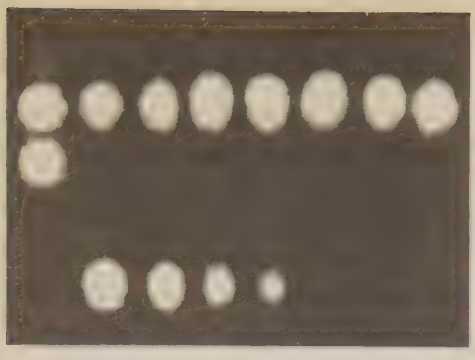
In Parallele zur Alkalistabilität läßt sich das Disaccharid mit Natriumborhydrid nicht reduzieren. Nach erschöpfender Behandlung mit dem Reduktionsmittel und anschließender Säurehydrolyse werden die beiden Bestandteile in äquimolaren Mengen wiedergefunden (Tab. 1/3).

Konnte bereits aus der fehlenden Anfärbbarkeit mit alkalischer 3,5-Dinitrosalicylsäure und 3,4-Dinitrobenzoesäure auf ein nicht reduzierendes Saccharid geschlossen werden, so wird durch die Alkalistabilität und fehlende Reduzierbarkeit auf quantitativer Basis bewiesen, daß die Oxogruppen beider Bestandteile an der glykosidischen Bindung beteiligt sind und somit ein 2-Desoxy-glucosyl-*D*-fructosid vorliegt.

Durch Invertase wird das Disaccharid rasch geöffnet (Abb. 9), wobei die Spaltungsgeschwindigkeit der des Rohrzuckers

---

+) Vgl. Methoden, S.104



Test 0,5 1 3 5 10 20 30 Min.

Abb. 9: Zeitliche Verfolgung der Spaltung von 2-Desoxy-rohrzucker durch β-*D*-Fructofuranosidase (Invertase). Dünnschichtchromatographie in System 1, Anfärbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

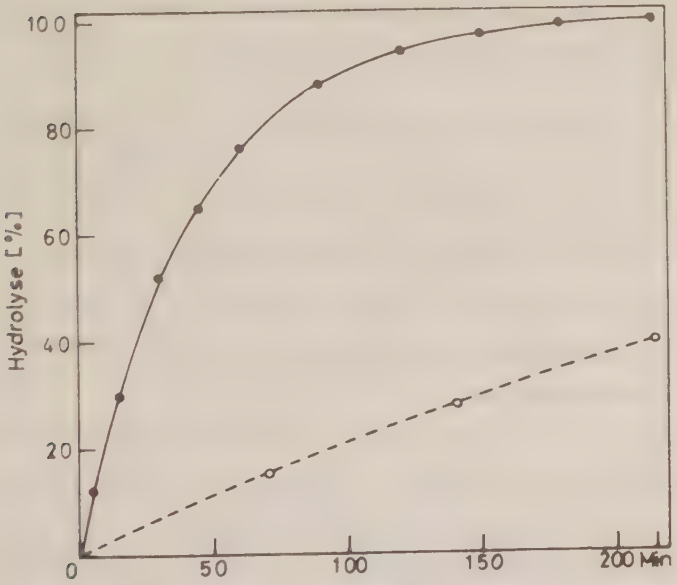
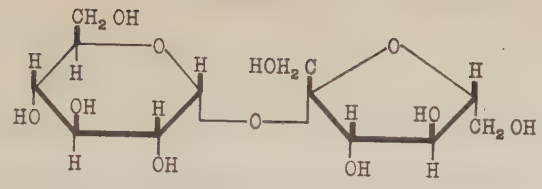


Abb. 10: Säurelabilität von 2-Desoxy-rohrzucker (•) im Vergleich zu Rohrzucker (o). Beide Disaccharide wurden in äquimolarer Konzentration ($5 \cdot 10^{-3}$ M) in 0,5 N HCl bei 20° inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch fermentative Messung der freigesetzten Fructose verfolgt.

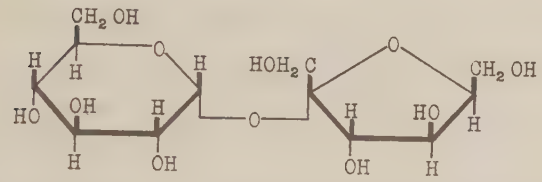
vergleichbar ist. Da außerdem das verwendete Fermentpräparat O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid und 2'-Desoxymaltose nicht hydrolysierte, kann die Spaltung des Desoxyglucosylfructosids als typische Invertasewirkung gelten. Nachdem Invertase für ß-*D*-Fructofuranoside spezifisch ist und α-*D*-Fructofuranoside sowie *D*-Fructopyranoside nicht angreift (36, 37), ist der Fructoseanteil im desoxyzuckerhaltigen Disaccharid als ß-*D*-Fructofuranosid zu betrachten.

Die Anomerieform des Desoxyglucoseanteils konnte fermentativ nicht ermittelt werden, da Desoxyglucoside durch Glucosidasen nicht gespalten werden (vgl. S.46). Das gefundene $[\alpha]_D^{20}$ von $+45^0 \pm 1^0$ (Tab. 7 und 8) läßt jedoch eine α-Bindung vermuten.

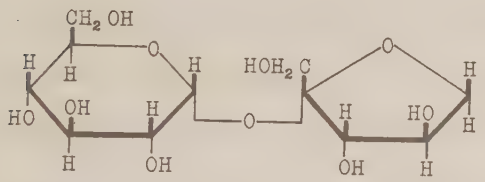
Die damit wahrscheinlich gewordene Strukturverwandtschaft zum Rohrzucker (I) wurde dadurch erhärtet, daß das Disaccharid einen charakteristischen Ausfall der RAYBINschen Probe ergab (vgl. Methoden, S.41). Die bei Behandlung mit alkalischer Diazouracillösung auftretende Blaugrünfärbung findet sich nur bei Rohrzucker, rohrzuckerhaltigen Tri- und Tetrasacchariden - z.B. Raffinose, Gentianose und Stachyose (38) - und den nahe strukturverwandten Aldosidoketosiden [II,III] (39), nicht aber bei Isorohrzucker [IV] und etwa 40 anderen Zuckern, Zuckeralkoholen und Polysacchariden (38). Da selbst das durch Invertase spaltbare O-Methyl-ß-*D*-fructofuranosid einen negativen Ausfall zeigt, wurde geschlossen, daß die Probe für den Rohrzuckerbindungstyp spezifischer ist als die Spaltbarkeit durch Invertase (36).



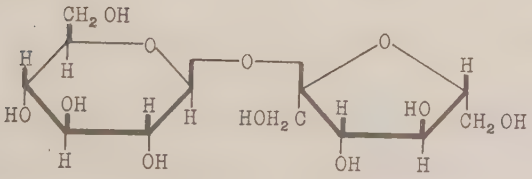
(I) Rohrzucker
(α-*D*-Glucopyranosyl-β-*D*-fructofuranosid)



(II) α-*D*-Glucopyranosyl-α-*L*-sorbofuranosid



(III) α-*D*-Glucopyranosyl-β-*D*-ketoxylofuranosid



(IV) Isorohrzucker
(β-*D*-Glucopyranosyl-α-*D*-fructofuranosid)

Die exakte Klärung der Ringkonfiguration in den beiden Monosaccharidanteilen erfolgte durch Perjodatoxydation, wobei nach vielfältig gesicherten Erfahrungen der Zuckerchemie nicht substituierte 1,2-Glykolgruppen oxydiert werden (40). Verwendet wurde Präparat II, das in allen Eigenschaften mit Präparat I übereinstimmt (Tab. 7 und 8, S.30).

Da bekannt war, daß 2-Desoxy-hexoside rascher oxydiert werden als Hexoside (41), wurde zum Vergleich O-Methyl-2-desoxy-α-D-glucopyranosid[+)] und Rohrzucker geprüft. Der [illegible] ist in Tab. 9 wiedergegeben. Es ergibt sich, daß 1 Mol "Desoxyrohrzucker" innerhalb 4 Stdn. 2 Mol Perjodat reduziert. In den folgenden 20 Stdn. ist eine langsame Weiteroxydation zu beobachten, die jedoch maximal einen Verbrauch von 0,2 Mol bedingt. Da Rohrzucker unter denselben Bedingungen nach Ablauf der gleichen Zeit vollständig oxydiert ist, kann als Ursache für den Mehrverbrauch die unvollständige Oxydation einer dritten Glykolgruppe ausgeschlossen werden. Es handelt sich offenbar um eine Nebenreaktion im Sinne einer Überoxydation, wie sie auch für O-Methyl-2-desoxy-α-D-glucopyranosid gefunden wurde (Tab. 9) und für andere nicht reduzierende Glykoside beschrieben ist (41, 42). Somit ist der Schluß berechtigt, daß das desoxyrohrzuckerhaltige Disaccharid im Gegensatz zu Rohrzucker nur zwei Glykolgruppierungen besitzt.

+) vgl. Fußnote, S.107

Tabelle 9

Zeitlicher Verlauf der Perjodatoxydation
(Perjodatverbrauch in Mol/Mol)

Oxydationsdauer (Stdn.)	1	2	4	6	8	10	24
Desoxyrohrzucker	1,62	1,88	2,03	2,06	2,10	2,17	2,22
O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid	1,00	1,03	1,04	1,06	1,09	1,11	
Rohrzucker	1,76	2,25	2,52	2,64	2,72	2,74	2,99

Tabelle 10

Molare Drehwerte

Berechnete Werte:	$[M]_D$
2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl-β-*D*-fructofuranosid	+146,7°
2-Desoxy-β-*D*-glucopyranosyl-β-*D*-fructofuranosid	-183,9°
2-Desoxy-β-*D*-glucopyranosyl-α-*D*-fructofuranosid	+ 95,4°
2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl-α-*D*-fructofuranosid	+426,4°
β-*D*-Fructofuranosyl-2-desoxy-*D*-glucose	- 21,9°
Gefundene Werte:	
Präparat I	+144,7°
.....	+149,7°
Präparat II, Extremwerte	+143,1°
.....	+148,7°
Mittelwert	+145,0°

Die Berechnung erfolgte durch Addition der molaren Drehwerte (45). Folgende $[\alpha]_D$-Werte wurden verwendet: O-Methyl-β-*D*-fructofuranosid -51,0° (36,46), O-Methyl-α-*D*-fructofuranosid +93° (36), O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid +138° (2), O-Methyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosid -48° (1), 2-Desoxy-*D*-glucose (nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes) +47° (2).

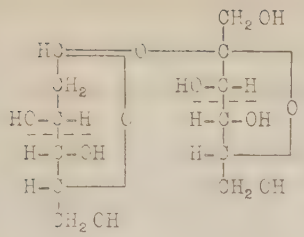
Während der Oxydation entstehen nur geringe und daher vernachlässigbare Mengen an Formaldehyd (0,08 Mol/Mol), wie sie - offenbar als Folge der Überoxydation - auch bei anderen nicht reduzierenden Pyranosiden gefunden wurden (41, 43, 44).

Prüft man unter Hydrolyse des entstandenen Oxydationsproduktes mit Thiobarbitursäure (vgl. Methoden, S.108), findet man 0,96 Mol Malonaldehyd pro Mol Disaccharid.

Aus den Ergebnissen der Perjodatoxydation können folgende Schlüsse gezogen werden (vgl. Schema 3): Das Fehlen von Formaldehyd unter den Oxydationsprodukten, der nur aus einer endständigen Glykolgruppe $-CHOH-CH_2OH$ entstehen kann, läßt für den Fructoseanteil nur Furanose- oder Pyranoseform zu und beschränkt den Desoxyglucoseanteil auf die Pyranose- oder Septanoseform+). Der Ausschluß der Furanoseform für den Desoxyglucoseanteil wird außerdem durch den nach Säurehydrolyse des Oxydationsproduktes nachgewiesenen Malonaldehyd bestätigt, da dieser nur entstehen kann, wenn die Hydroxylgruppen an C-3 und C-4 nicht substituiert sind (Schema 3). Von den verbleibenden Ringkonfigurationen läßt der Verbrauch von 2 Mol Perjodat pro Mol Disaccharid für den Desoxyglucoseanteil nur die Pyranose- und für den Fructoseanteil nur die Furanoseform zu, da ein Septanosering von ersteren sowie ein Pyranose-

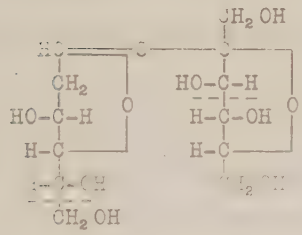
---

+) Der [illegible] Septanosering hat die Sauerstoffbrücke zwischen C-1 und C-6 und damit einen Ring aus 7 Atomen zum Unterschied vom Pyranosering mit 6 und dem Furanosering mit 5 Atomen.



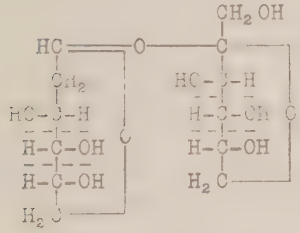
2-Desoxy-glucopyranosyl-
fructofuranosid

2Mol Perjodat
1Mol Malonaldehyd
kein Formaldehyd



2-Desoxy-glucofuranosyl-
fructofuranosid

2Mol Perjodat
kein Malonaldehyd
1Mol Formaldehyd



2-Desoxy-glucoseptanosyl-
fructopyranosid

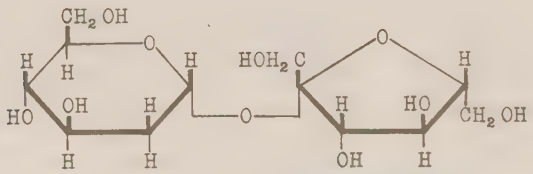
4Mol Perjodat
1Mol Malonaldehyd
kein Formaldehyd

Schema 3: Zum Perjodatabbau von Desoxyrohrzucker (2-Desoxy-glucopyranosyl-fructofuranosid). Malonaldehyd $CHO \cdot CH_2 \cdot CHO$ entsteht nach Hydrolyse des Oxydationsproduktes aus C-1 bis C-3 eines Desoxyglucopyranosyl- oder -septanosylringes; bei der Furanoseform wird die Bildung durch die Substitution an C-4 verhindert.

ring des letzteren jeweils nicht substituierte Hydroxylgruppen an C-3, C-4 und C-5 bedingt und damit bereits pro Monosaccharideinheit einen Verbrauch von 2, für das Disaccharid aber von mindestens 3 Mol Perjodat ergäbe.

In Tab. 10 sind die berechneten molaren Drehwerte für verschiedene desoxyglucose- und fructosehaltige Disaccharide zusammengestellt. Nach dem oben geführten Beweis der Ringkonfigurationen, die den Berechnungen zugrundegelegt sind, beweist der $[M]_D$-Wert des Disaccharides von $+143^\circ$ bis $+150^\circ$ für den Desoxyglucoseanteil die -Form und für den Fructoseanteil die bereits durch Invertasespaltung ermittelte ß-Form. Alle anderen Anomeriemöglichkeiten sind, wie bereits aus dem charakteristischen Ausfall der RAYBINschen Probe vermuten werden konnte, zweifelsfrei auszuschließen.

Damit besitzt das gefundene Disaccharid die Struktur



2-Desoxy-rohrzucker
(2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl-β-*D*-fructofuranosid)

und stellt das 2-Desoxy-derivat des natürlich vorkommenden Rohrzuckers dar.

Abb. 10 zeigt die große Säurelabilität der Verbindung. Sie wird wesentlich rascher gespalten als der an sich sehr säurelabile Rohrzucker. Die beträchtliche Erhöhung der Säurelabilität der glykosidischen Bindung an C-1 durch eine benachbarte 2-Desoxy-gruppe steht in Übereinstimmung mit an Methylglykosiden (2, 47 - 50) und 2-Desoxy-hexose-1-phosphaten (13) gemachten Beobachtungen.

2. Desoxyzuckerhaltige Glucobiosen

Die Verbindungen B_1, B_{2a} und C_1 zeigen bei Anfärbung mit Perchlorsäure/Aceton, Vanillin/Perchlorsäure und dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens (Abb. 13 – 15) die für 2-Desoxy-zucker charakteristische [illegible] mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure [illegible] [illegible]

Verbindung C_1: 2'-Desoxy-maltose

[illegible] Abb. 11 hervor.

Verbindung C_1 ist nach 25 Min. in 0,1 N NaOH bei 100° [illegible] als reduzierend gelten (Methoden, S.105).

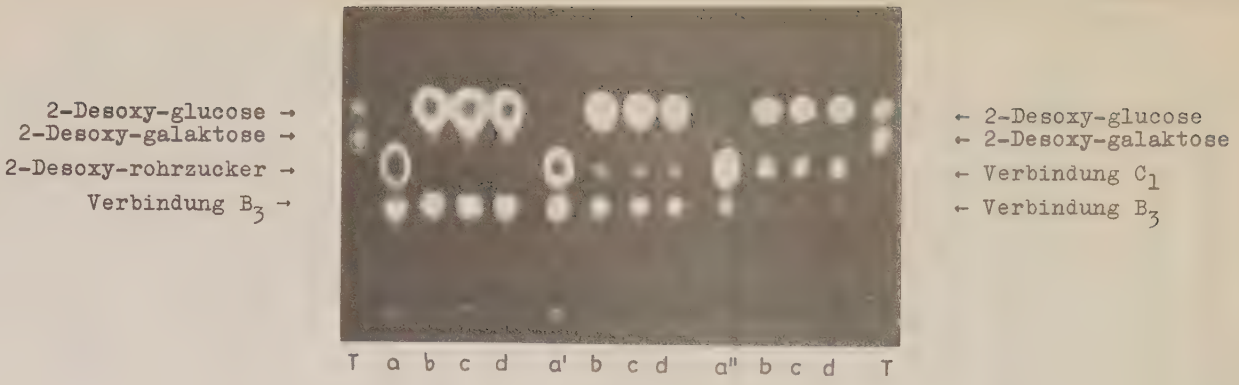


Abb. 11: Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Verbindung C_1 und B_3 in den Fraktionen 62 (a), 63 (a') und 64 (a'') aus Versuch 5. b, c und d zeigen die jeweiligen Fraktionen nach 30-, 60- und 180minütiger Inkubation mit Invertase, wobei, kenntlich an der Zunahme von 2-Desoxy-glucose, 2-Desoxy-rohrzukker gespalten wird und in den Fraktionen 63 und 64 die invertaseresistente Verbindung C_1 erkannt werden kann. Nach papierchromatographischer Prüfung tritt Verbindung C_1 erst ab Fraktion 63 auf, während Verbindung B_3 von Fraktion 62 bis Fraktion 64 kontinuierlich abnimmt.
Dünnschichtchromatographie in System 2, Färbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

Nach erschöpfender Säurehydrolyse wurde nur 2-Desoxyglucose und Glucose gefunden und für die beiden Bestandteile ein molares Verhältnis von 1 : 1,04 ermittelt. (Tab. 11).

Die Verbindung wurde in 0,1 N HCl auf dem siedenden Wasserbad in weniger als 4 Min. gespalten (Tab. 11). Wie im Abschnitt über Desoxyrohrzucker gezeigt wurde, läßt die Säurelabilität erwarten, daß die glykosidische Bindung von C-1 des Desoxyglucoseanteiles ausgeht. Der Beweis hierfür wurde durch Reduktion der freien Aldehydgruppe im Molekül mittels Borhydrid und anschließende Säurehydrolyse erbracht. Danach war Glucose fermentativ nicht mehr nachweisbar, während Desoxyglucose vollständig wiedergefunden wurde (Tab. 11). Der hierbei als Zuckeralkohol zu erwartende Sorbit wurde als solcher durch die Umsetzbarkeit mit Sorbit-Dehydrogenase identifiziert.

Durch die vollständige Reduzierbarkeit des Glucoseanteils und das für die beiden Bestandteile gefundene molare Verhältnis von 1:1 ist die Verbindung als Disaccharid charakterisiert und der Glucoseanteils als reduzierendes Molekülende erkannt. Das nächst höhere, aus äquimolaren Mengen der beiden Bestandteile aufgebaute Homologe wäre ein Tetrasaccharid, nach dessen Reduktion neben Sorbit die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Glucose wiedergefunden werden müßte.

Zur Klärung der Bindungsstelle am Glucoseanteil wurde das Disaccharid mit Perjodat oxydiert und das Oxydationsprodukt nach Reduktion mit Borhydrid hydrolysiert (vgl.

Tabelle 11

Quantitative Untersuchungen an Verbindung C_1

Präparat I aus Tabakblättern	
1) Hydrolyse (0,1 N HCl, 100°, 4 Min.)	
Desoxyglucose (µMol/ml)	20,30
Glucose (µMol/ml)	21,05+)
Desoxyglucose : Glucose (Mol/Mol)	1 : 1,04
2) Behandlung mit Borhydrid und Hydrolyse	
Desoxyglucose (µMol/ml)	21,19
Glucose (µMol/ml)	0
Desoxyglucose vor und nach Behandlung mit Borhydrid	1 : 1,04
3) Spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$	+135,1° bis +140,8°
Präparat II aus Meerrettichblättern	
1) Hydrolyse (0,1 N HCl, 100°, 7 Min.)	
Desoxyglucose (µMol/ml)	8,74
Glucose (µMol/ml)	9,12
Glucose : Desoxyglucose (Mol/Mol)	1,04 : 1
2) Spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$	+135,1° bis +140,8°

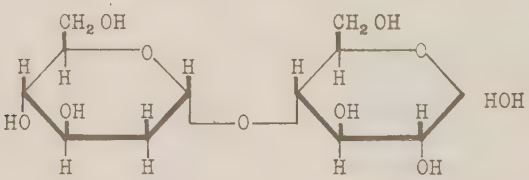
Die Konzentrationsangaben sind auf die jeweilige Ausgangslösung von Präparat I bzw. Präparat II bezogen. Die Messung der Desoxyglucose erfolgte mit der Thiobarbitursäuremethode (S.100), die Messung der Glucose mittels Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (S.102).

+) Der gleiche Wert wurde nach Verlängerung der Hydrolysendauer auf 7 und 10 Min. gefunden, was zeigt, daß die Hydrolyse nach 4 Min. vollständig ist.

Schema 4). Bei Dünnschichtchromatographie in System 3 waren hiernach wie bei der zum Vergleich entsprechend behandelten Maltose Glycerin und Erythrit nachweisbar. Da Erythrit aus einer Hexose nur bei deren Substitution an C-4 und C-5 entstehen kann, muß er dem subst-ituierten Molekülanteil, d.h. der endständigen Glucose entstammen und spricht für den Sitz der glykosidischen Bindung an C-4. Das Auftreten von Glycerin zeigt, daß der Desoxy-glucosylanteil Pyranoseform besitzt, da im Falle eines Furanose- oder Septanoseringes anstelle von Glycerin 2-Desoxy-*D*-xylose bzw. Äthylenglykol entstehen müßte.

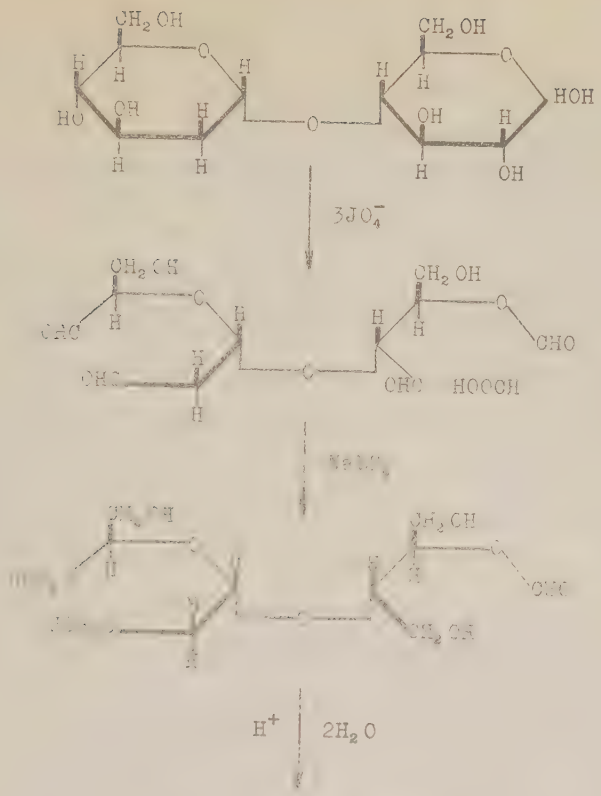
Die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ von +125,1° bis +129,6° beweist, wie aus Tab. 12 ersichtlich, eine α-glykosidische Bindung.

Damit besitzt Verbindung C_1 die Struktur



2'-Desoxy-maltose
4-O-[2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl]-*D*-glucose

Trotz der α-glykosidischen Bindung wird 2'-Desoxy-maltose durch ein handelsübliches Maltasepräparat nur extrem langsam gespalten. Während Maltose unter denselben Bedingungen bereits nach 30 Min. vollständig geöffnet ist, werden aus 2'-Desoxy-maltose die ersten Spuren an Desoxyglucose erst nach 120 Min. nachweisbar und selbst nach 16 Stdn. ist



β-Hydroxy-propionaldehyd

Glycerin

Erythrit

Schema 4: Perjodatabbau von [illegible]-maltose mit nachfolgender Reduktion des Oxydationsproduktes durch Natriumborhydrid und Säurehydrolyse des reduzierten Oxydationsproduktes.

Tabelle 12: Molare Drehwerte

Berechnete Werte	$[M]_D$
4-O-[2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl]-*D*-glucose[+)]	+408,3°
6-O-[2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl]-*D*-glucose	+348,0°
4-O-[2-Desoxy-β-*D*-glucopyranosyl]-*D*-glucose	+ 95,0°
4-O-[2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl]-2-desoxy-*D*-glucose[+)]	+390,5°
4-O-[2-Desoxy-β-*D*-glucopyranosyl]-2-desoxy-*D*-glucose	+ 77,6°
Gefundene Werte	
Verbindung C_1 (2'-Desoxy-maltose, Präparat I)	+407,7°
[illegible]	+412,5°
Verbindung B_1 (2,2'-Didesoxy-glucobiose)	+359,9°
[illegible]	+377,0°

[+)] Gleiche Werte errechnen sich für das α(1→4)- und β(1→4)-Isomer, da die spezifische Drehung von Kojibiose und Nigerose mit der von Maltose identisch ist (vgl.l.c.52).

Zur Berechnung: Die für 2'-Desoxy-maltose durch Addition der molaren Drehwerte von 4-O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid und *D*-Glucose berechnete molare Drehung von +340,5° weicht von den gefundenen Werten um 67,2° bis 82° ab. Da sich für die molare Drehung der Maltose zwischen dem gefundenen und in analoger Weise berechneten Wert ebenfalls eine Differenz von 67,4° ergibt, ist diese offensichtlich durch die Substitution am asymmetrischen C-4 des endständigen Glucoseanteils bedingt. Zur Berücksichtigung dieses Faktors wurde die durch die α-Methylengruppe bedingte Drehungsänderung aus der Differenz der molaren Drehung von Methyl-α-*D*-glucopyranosid und Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid berechnet und dieser Wert (62,66°) von der molaren Drehung der Maltose (+470,59°) in Abzug gebracht. Die übrigen Werte wurden in gleicher Weise berechnet. Für die 2,2'-Didesoxy-glucobiosen wurde die Drehungsänderung durch die zweite α-Methylengruppe durch zusätzlichen Abzug der Differenz der molaren Drehwerte von *D*-Glucose und 2-Desoxy-*D*-glucose berücksichtigt.

Zur Berechnung wurden folgende $[\alpha]_D$-Werte verwendet: O-Methyl-2-desoxy-α- bzw. -β-*D*-glucopyranosid +138° bzw. -48,2°, O-Methyl-α- bzw. -β-*D*-glucopyranosid +158,9° bzw. -31,97° (nach l.c.49), Glucose +52,7°, Maltose +137,6°, Isomaltose +121°, Cellobiose +34,6° (nach l.c.52).

die gespaltene Menge noch äußerst gering[+)] (Abb. 13, linke Seite). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der bereits früher nachgewiesenen Unangreifbarkeit von Methyl- und Phenyl-2-desoxy-glucopyranosiden durch Glucosidasen (2, 51).

Das aus Meerrettichblättern gewonnene Präparat II erschien bei Papierchromatographie in Fließmittel a, c und g als einheitlich und zeigte dabei denselben $R_{Desoxyrohrzucker}$-Wert wie Präparat I. Es wurde durch milde Säurehydrolyse (0,1 N HCl, 100°, 7 Min.) größtenteils gespalten, erwies sich als alkalilabil und gleichfalls aus äquimolaren Mengen von 2-Desoxy-glucose und Glucose aufgebaut (Tab. 11). Die spezifische Drehung von +135 bis +141° zeigt wiederum eine α-glykosidische Bindung an, liegt aber etwas höher als für Präparat I (vgl. Tab. 11). Bei Behandlung mit Maltase wird bereits nach 2 Min. eine kleine Menge an Desoxyglucose frei, die aber in den folgenden Stunden wie bei Präparat I nur eine äußerst geringe Zunahme erfährt (Abb. 13, rechte Seite). Die sofortige Freisetzung von Desoxyglucose legt nahe, daß in Präparat II die 2'-Desoxymaltose von geringen Mengen der stellungsisomeren 4-O-[α-*D*-Glucopyranosyl]-2-desoxy-*D*-glucose begleitet ist, die eine normale Spaltbarkeit durch Maltase

---

+) Um zu prüfen, ob die langsame Spaltung der 2'-Desoxymaltose überhaupt durch Maltase erfolgt, wäre ein völlig reines Enzympräparat erforderlich, da bekannt ist, daß Phenyl-2-desoxy-glucopyranoside durch Mannosidasen gespalten werden (51).

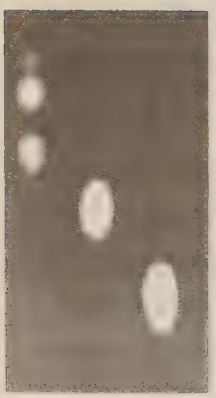


Abb. 12: Dünnschichtchromatographie der isolierten Verbindungen B_1 und C_1 in System 1 (zweimaliger Lauf mit Zwischentrocknung). Vergleichssubstanzen: 1) 2-Desoxy-ribose, 2) 2-Desoxy-glucose, 3) 2-Desoxy-galaktose. Anfärbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

Abb. 13: Maltasewirkung auf Verbindung C_1 aus den Tabakpflanzen von Versuch 3 (Präparat I, links) und aus den Meerrettichblättern von Versuch 2 (Präparat II, rechts). 5 und 16 = Inkubationsdauer in Stdn. T = Vergleichssubstanzen: 1) 2-Desoxy-ribose, 2) 2-Desoxy-glucose, 3) 2-Desoxy-galaktose. Dünnschichtchromatographie und Färbung wie in Abb. 12.

erwarten läßt. Eine derartige Verunreinigung erklärt auch den abweichenden Wert der spezifischen Drehung, da die vermutete 2-Desoxy-maltose aufgrund ihrer glucosidischen Bindung durch die 4 Min. Hydrolyse nicht gespalten wird und damit in die Konzentrationsbestimmung nicht mit eingeht.

Die vorhandene Menge an Präparat II reicht nicht aus, um nach milder Säurehydrolyse die stabile 2-Desoxy-maltose darzustellen und zu identifizieren.

2,2'-Didesoxy-glucobiosen

Verbindung B_1 ist alkalilabil und wird in verdünnter Mineralsäure ähnlich rasch wie 2'-Desoxy-maltose gespalten. Im Hydrolysat wurde dünnschichtchromatographisch nur 2-Desoxy-glucose gefunden. Das Vorhandensein von *D*-Glucose wurde durch Messung mittels Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ausgeschlossen. Da der durch Hydrolyse frei gewordene Desoxyzucker durch Glucose-Oxydase vollständig umgesetzt wird (Tab. 13), ist er aufgrund der Substratspezifität des Fermentes als 2-Desoxy-*D*-glucose charakterisiert.

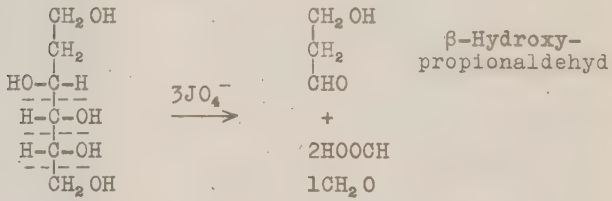
Nach Reduktion mit Borhydrid und anschließender Säurehydrolyse wurde bei Dünnschichtchromatographie in System 2 neben 2-Desoxy-glucose, wie nach der Alkalilabilität zu erwarten, auch 2-Desoxy-sorbit gefunden, der wie authen-

Tabelle 13

Quantitative Untersuchungen an Verbindung B_1

1) Hydrolyse (0,1 N HCl, 100°, 7 Min.)	
Desoxyglucose (µMol/ml)	
Thiobarbitursäuremethode	6,9
Glucose-Oxydase	6,6
2) Behandlung mit Borhydrid und Hydrolyse	
Desoxyglucose (µMol/ml)	3,5
Desoxyglucose vor und nach Behandlung mit Borhydrid	1,93 : 1

Die Konzentrationsangaben sind auf die Ausgangslösung bezogen.



Schema 5: Zum Nachweis von 2-Desoxy-sorbit bei der Dünnschichtchromatographie. Durch Oxydation mit Perjodsäure entsteht aus 2-Desoxy-sorbit β-Hydroxy-propionaldehyd, der als α-Methylenaldehyd mit dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens in charakteristischer Weise reagiert (Methoden, S.94). Ohne vorausgehende Oxydation bleibt 2-Desoxy-sorbit ungefärbt und ist dadurch von den 2-Desoxy-aldosen zu unterscheiden.

tische Substanz mit dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens erst nach vorausgehender Oxydation mit Perjodsäure reagierte (Schema 5).

Nach Reduktion und Hydrolyse wurden nurmehr 50 % der ursprünglich vorhandenen Desoxyglucose gefunden (Tab. 13). Zusammen mit der Bausteinanalyse zeigt dieses Ergebnis, daß es sich um eine reduzierende 2,2'-Didesoxy-glucobiose handelt.

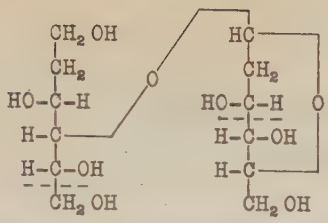
Das gefundene $[\alpha]_D^{20}$ von +115,9 bis + 121,6° beweist auch hier eine α-glykosidische Bindung (vgl. Tab. 12).

Der Sitz der glykosidischen Bindung am reduzierenden Molekülende konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Bei der vorläufigen Untersuchung wurde davon ausgegangen, daß das Disaccharid bei Perjodatoxydation und nachfolgender Hydrolyse 2 Moleküle Malonaldehyd liefert, wenn der Desoxyglykosylanteil in Pyranoseform vorliegt und das reduzierende Molekülende an C-3 und C-4 nicht substituiert ist, d.h. eine (1→6)-Bindung vorliegt. Gefunden wurden 1,18 Mol Malonaldehyd pro Mol B_1 , was, sieht man von der wenig wahrscheinlichen Furanoseform des Desoxyglucosylrestes ab, somit für eine (1→3)- oder (1→4)-Bindung spricht.

Verbindung B_{2a} ist ebenfalls alkalilabil und läßt wie B_1 nach vollständiger Säurehydrolyse als einzigen Bestandteil 2-Desoxy-glucose erkennen, so daß es sich auch

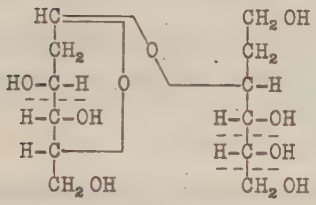
in diesem Fall um eine 2,2'-Didesoxy-glucobiose handeln dürfte. Weitere Untersuchungen zur Struktur stehen noch aus. Da Verbindung B_{2a} papierchromatographisch deutlich langsamer wandert als B_1 (Tab. 3, S.19) ist an eine (1→6)-Bindung zu denken.

Es ist beabsichtigt, die beiden Didesoxyglucobiosen in größerer Menge darzustellen und ihre Struktur mit Hilfe des Perjodatverbrauchs zu klären. Da jedoch infolge der Halbacetalform am reduzierende Ende zwischen (1→3)-, (1→4)- und (1→5)-Bindung nicht unterschieden werden kann, muß diese durch Überführung der Didesoxyglucobiosen in die Didesoxyglucobiite beseitigt werden. Nach Sicherung der Pyranoseform für den Desoxyglucosylanteil durch Prüfung auf Malonaldehyd, lassen, wie Schema 6 zeigt, Perjodatverbrauch und Messung des entstandenen Formaldehyds alle 4 möglichen Bindungsisomeren eindeutig differenzieren.



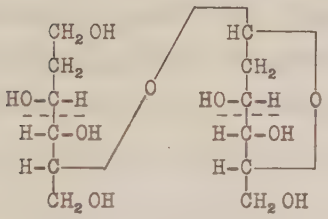
(1→4)-Didesoxyglucobiit

2Mol Perjodat
1Mol Formaldehyd



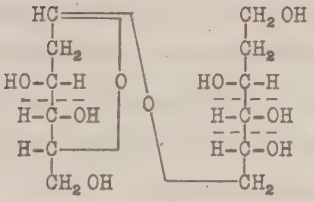
(1→3)-Didesoxyglucobiit

3Mol Perjodat
1Mol Formaldehyd



(1→5)-Didesoxyglucobiit

2Mol Perjodat
kein Formaldehyd



(1→6)-Didesoxyglucobiit

3Mol Perjodat
kein Formaldehyd

Schema 6: Zur Strukturaufklärung der in die Zuckeralkohole umgewandelten 2,2'-Didesoxy-glucobiosen durch Perjodatoxydation. Formaldehyd entsteht dabei nur aus endständigen Glykolgruppen ($-CHOH-CH_2OH \rightarrow -CHO + CH_2O$).

3. Vorläufige Untersuchungen an Verbindung A_2

Verbindung A_2 konnte in sämtlichen untersuchten Pflanzen bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von Quetschpräparaten (Methoden, S.88) gefunden werden, wo sonst neben den Desoxyhexosen nur Desoxyrohrzucker erkennbar ist (Abb. 20).

Von der Kohle-Celite-Säule wird die Verbindung mit 7,5-proz. Äthanol eluiert und erscheint dabei nach der Hauptmenge von Desoxyrohrzucker. Bei Papier- und Dünnschichtchromatographie wandert die Verbindung wesentlich rascher als die 2-Desoxy-hexosen (Tab. 2, S.18), eine Eigenschaft, die beispielsweise auch O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid zeigt.

Mit Perchlorsäure/Aceton und dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens findet man die für 2-Desoxy-zucker charakteristische Färbung. Die blaugrüne Färbung mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure erweist die Verbindung als ketosenfrei; wodurch der vom üblichen Oliv abweichende Farbton verursacht wird, ist noch nicht geklärt.

Erhitzt man A_2 in 0,1 N NaOH 45 Min. auf dem siedenden Wasserbad, so bleibt die Verbindung dünnschichtchromatographisch unverändert nachweisbar und ist daher als nicht reduzierend zu betrachten (Methoden, S.104).

Durch milde Säurehydrolyse (0,1 N HCl, 100°, 5 Min. oder 0,1 N HCl, 36°, 4 Stdn.) wird die Verbindung vollständig gespalten. Die Säurelabilität spricht auch hier für den Sitz der glykosidischen Bindung an C-1 des Desoxyglykosylanteils.

Bei dünnschichtchromatographischer Prüfung des neutralisierten Hydrolysats in System 1 findet man 2-Desoxy-glucose und eine weitere Verbindung (Aglykon), die rascher als das nicht hydrolysierte Saccharid wandert und nach Anfärbung mit dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens im UV-Licht bräunlichgrün fluoresziert. Behandelt man das neutralisierte Hydrolysat 45 Min. in 0,1 N NaOH bei 100°, so bleibt das Aglykon im Gegensatz zu 2-Desoxy-glucose unverändert nachweisbar.

Nach den vorläufigen Untersuchungen handelt es sich um ein nicht reduzierendes 2-Desoxy-glucosid. Für das Aglykon lassen sich bereits eine Reihe von Möglichkeiten ausschließen. Aufgrund der Braungrünfluoreszenz bei Färbung mit dem 3,5-Diaminobenzoe-Säure-Reagens scheidet eine 2-Desoxy-aldose, infolge der Alkalistabilität ganz allgemein jeder Zucker aus. Glycerin und andere Polyole sowie auch Inosit kommen weder nach dem färberischen Verhalten noch nach der dünnschichtchromatographischen Wanderungsgeschwindigkeit in Frage.

Weitere Untersuchungen zur Struktur des Aglykons sind im Gange.

4. Verbindung B_3

2-Desoxy-ß-*D*-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin

Von den zahlreichen gefundenen desoxyzuckerhaltigen Verbindungen erschien Saccharid B_3 besonders interessant, da es in größerer Menge nur nach Verabfolgung von 2-Desoxy-*D*-galaktose auftrat und daher als erste Verbindung diesen Zucker als Molekülbestandteil vermuten ließ.

Verbindung B_3 färbt sich mit Perchlorsäure/Aceton, Vanillin/Perchlorsäure und dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens in der für 2-Desoxy-zucker charakteristischen Weise. Mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure findet man Oliv-färbung, was die Verbindung wieder als desoxyzuckerhaltig und frei von Ketosen erweist. Die ausbleibende Färbung mit alkalischer Lösung von 3,5-Dinitrosalicylsäure oder 3,4-Dinitrobenzoesäure spricht für ein nicht reduzierendes Saccharid. In Übereinstimmung damit wird die Verbindung durch Silbernitrat verlangsamt und nur schwach gefärbt.

Verbindung B_3 wandert bei Papierchromatographie in Fließmittel a rascher (Tab. 3, S.19), bei Dünnschichtchromatographie in System 2 langsamer als Desoxyrohrzucker (Abb. 11, S.43). Die $R_{Desoxyrohrzucker}$-Werte betragen 1,40 bzw. 0,72.

Wie Abb. 14 zeigt, bleibt die Verbindung nach 45 minütigem Erhitzen in 0,1 N NaOH auf dem siedenden Wasserbad unverändert nachweisbar und darf daher wie Desoxyrohrzucker

Abb. 14: Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis der Alkalistabilität von Verbindung B_3. a) Verbindung B_3 unbehandelt, b) nach 45 Min. in 0,1 N NaOH bei 100°. T = Testsubstanzen: 1) 2-Desoxy-ribose, 2) 2-Desoxy-glucose, 3) 2-Desoxy-galaktose. Links: Dünnschichtchromatographie in System 1, rechts: in System 4. Anfärbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

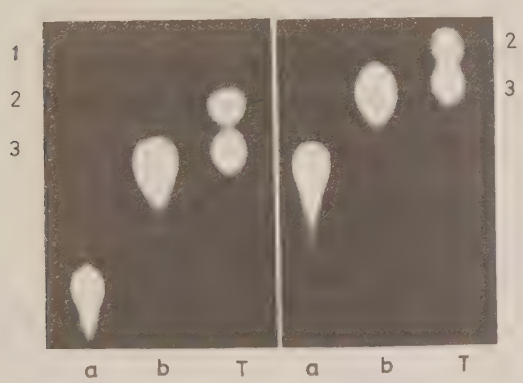


Abb. 15: Dünnschichtchromatographischer Nachweis von 2-Desoxy-galaktose im Hydrolysat von Verbindung B_3. a) Verbindung B_3 unbehandelt, b) nach 5 Min. in 0,1 N HCl bei 100°. T = Testsubstanzen: 1) 2-Desoxy-ribose, 2) 2-Desoxy-glucose, 3) 2-Desoxy-galaktose. Links: Dünnschichtchromatographie in System 1, rechts: in System 2. Anfärbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

und Verbindung A_2 als nicht reduzierend gelten (vgl. Methoden, S.104).

In 0,1 N HCl wird die Verbindung bei 100° in weniger als 5 Min. vollständig gespalten und zeigt damit die für desoxy-glykosidische Bindungen charakteristische Säurelabilität.

Im Hydrolysat fand sich bei Dünnschichtchromatographie in System 1 und 2 unter Anfärbung mit 3,5-Diaminobenzoesäure oder Anisaldehyd ausschließlich 2-Desoxy-galaktose (Abb. 15), so daß - sieht man von einem wenig wahrscheinlichen Desoxygalaktosyl-desoxygalaktosid ab, - nur ein nicht reduzierendes Molekül als Bindungspartner des Desoxyzuckers in Frage kam. In Bestätigung dessen wurde eine zweite, nur mit Silbernitrat anfärbbare Verbindung gefunden, die dünnschichtchromatographisch den gleichen R_F-Wert wie Glycerin aufwies, das seinerseits gegenüber anderen Polyolen einwandfrei abzugrenzen ist (Abb. 16).

Die beiden im Hydrolysat gefundenen Glykosidbestandteile sind wie folgt charakterisiert: der Desoxyzucker als 2-Desoxygalaktose durch den R_F-Wert in sämtlichen 3 Dünnschichtsystemen, als 2-Desoxy-aldose durch die für α-Methylenaldehyde charakteristische Fluoreszenz nach Färbung mit dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens, als 3,4-cis-Hydroxyverbindung durch die Entstehungsgeschwindigkeit von Malonaldehyd bei Perjodatoxydation (Abb. 17) und schließlich als zur *D*-Galaktose-Reihe gehörig durch die Umsetzbarkeit seitens der hierfür spezifischen (23)

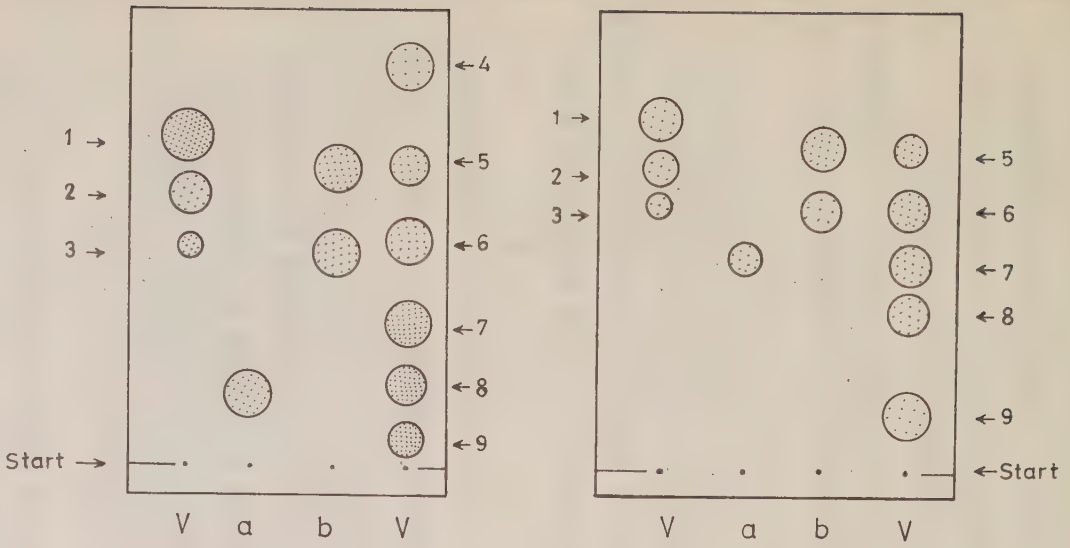


Abb. 16: Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Glycerin im Hydrolysat von Verbindung B_3. a) Verbindung B_3 vor, b) nach Säurehydrolyse (0,1 N HCl, 100°, 5 Min.). V = Vergleichssubstanzen: 1) 2-Desoxy-ribose, 2) 2-Desoxy-glucose, 3) 2-Desoxy-galaktose, 4) Äthylenglykol, 5) Glycerin, 6) Erythrit, 7) Arabit, 8) Sorbit und Dulcit, 9) meso-Inosit. Links: Dünnschichtchromatographie in System 1, rechts: in System 3. Anfärbung: Silbernitrat.

D-Galaktose-Oxydase aus Dactylium dendroides (Tab. 14 S.66). Glycerin ist identifiziert durch die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie authent. Substanz in Dünnschichtsystem 2 und 3, durch die ausschließliche Anfärbbarkeit mit Silbernitrat sowie durch die Umsetzbarkeit mittels Glycerokinase und Glycerinphosphat-Dehydrogenase.

Im nicht hydrolysierten Präparat sind beide Verbindungen chromatographisch, Glycerin auch fermentativ, nicht nachweisbar.

Nach Messung im Hydrolysat liegen Desoxygalaktose und Glycerin in äquimolaren Mengen vor (Tab. 14), woraus in Übereinstimmung mit Alkalistabilität und Säurelabilität auf ein 2-Desoxygalaktosyl-glycerin geschlossen werden darf.

Zur Ermittlung der Ringform des Desoxygalaktosylanteils wurde in Perjodsäurelösung oxydiert und mittels Thiobarbitursäure unter gleichzeitiger Hydrolyse auf Malonaldehyd geprüft (vgl. Methoden, S.107). Nach Abb. 17 wird das intakte Saccharid praktisch mit derselben Geschwindigkeit wie 2-Desoxy-galaktose an C-3 und C-4 oxydiert. Nach beendeter Oxydation wurde 1,05 Mol Malonaldehyd pro Mol B_3 gefunden, was, wie auf S. ausgeführt, einen Furanosering im Desoxygalaktosylanteil ausschließt.

Als weiteres Kriterium konnte die Umsetzbarkeit durch Galaktose-Oxydase herangezogen werden, da das Ferment nur Galaktopyranoside (23), nicht aber Galaktofuranoside (53) oxydiert. Wie aus Abb. 18 hervorgeht, wird Verbindung B_3 rasch und vollständig oxydiert. Die Umsatz-

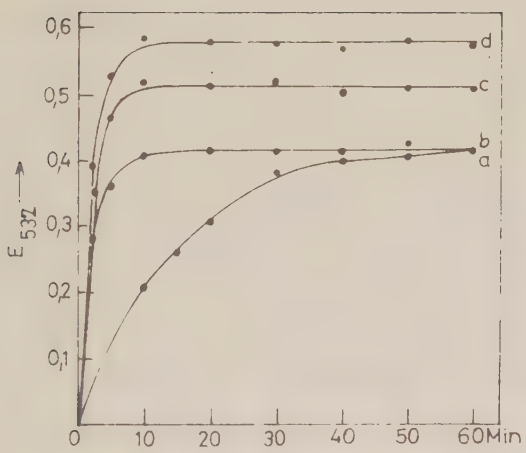


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der Malonaldehydbildung aus 2- Desoxy-aldosen bei Oxydation mit Perjodsäure (20°). Die Messung erfolgte mit der Thiobarbitursäuremethode (S.100). a) Authent. 2-Desoxy-glucose (12,2 nMol), b) authent. 2-Desoxy-galaktose (12,2 nMol), c) Desoxyzucker im Hydrolysat von Verbindung B_3 (15 nMol), d) intakte Verbindung B_3 (15,8 n Mol). Der nach Oxydation von B_3 in Acetalform vorliegende Malonaldehyd wird während der Kopplung mit Thiobarbitursäure freigesetzt (vgl. Methoden, S.107).

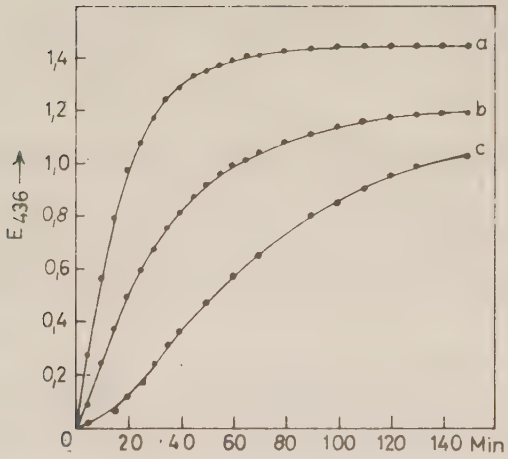
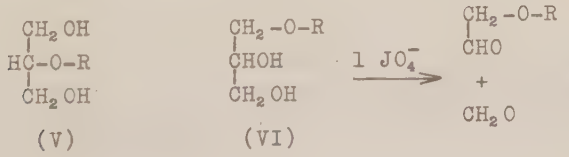


Abb. 18: Oxydation von Verbindung B_3 (a), *D*-Galaktose (b) und 2-Desoxy-*D*-galaktose (c) durch *D*-Galaktose-Oxydase aus Dactylium dendroides. Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,2, 66 γ Di-o-anisidin, 40 γ Peroxydase, 56 E Galaktose-Oxydase. Eingesetzte Zuckermengen: Verbindung B_3 0,17 µMol, *D*-Galaktose und 2-Desoxy-*D*-galaktose 0,15 µMol. Die Messung erfolgte gegen einen zuckerfreien Leerwert.

geschwindigkeit ist größer als für Galaktose und Desoxygalaktose, was mit der rascheren Umsetzbarkeit einiger Galaktoside im Vergleich zu Galaktose (23) in Einklang steht. Die Oxydierbarkeit von Verbindung B_3 beweist für den Desoxygalaktosylanteil Pyranoseform, da jene nicht nur einen Furanosering sondern durch Angriff des Fermentes an C-6 (23) auch einen Septanosering ausschließt. Nach Ausschluß des Furanoseringes konnte zur Ermittlung der Bindungsstelle der Desoxygalaktose am Glycerin die Prüfung auf Formaldehyd nach Perjodatoxydation herangezogen werden. Bei Bindung an die sekundäre Alkoholgruppe des Glycerins (V) ist dieses durch Perjodat unangreifbar, während bei Bindung an eine der primären Alkoholgruppen (VI) durch Oxydation der endständigen Glykolgruppe 1 Mol Formaldehyd zu erwarten ist.



Nach 5- und 24-stdger Oxydation, wobei die Bedingungen so gewählt wurden, daß keine Hydrolyse der Verbindung erfolgte (vgl. Methoden, S.106), wurde 1,03 Mol Formaldehyd pro Mol B_3 gefunden. Damit ist der Sitz der Bindung am C-1 des Glycerinanteils bewiesen (VI).

Zur weiteren Prüfung der ermittelten Struktur wurde der Perjodatverbrauch bestimmt. Tab. 15 gibt den zeitlichen Ablauf der Reaktion wieder. Man erkennt einen raschen Verbrauch von 2 Mol Perjodat pro Mol Saccharid innerhalb

Tabelle 14

Bestandteile der Verbindung B_3 (im Hydrolysat bestimmt)

	µMol / ml Ausgangslösung
Desoxygalaktose	
Thiobarbitursäuremethode	35,58
Galaktose-Oxydase	35,62
Glycerin	36,08

Tabelle 15

Zeitlicher Verlauf der Perjodatoxydation von Verbindung B_3 (Perjodatverbrauch in Mol/Mol)

Stdn.	2	4	6	9,5	24
Versuch 1	1,83	2,03	2,07	2,07	2,16
Versuch 2	1,77	2,01	2,03	2,07	2,19

Tabelle 16

Theoretische Mengen an verbrauchtem Perjodat und gebildetem Formaldehyd für die möglichen Ring- und Bindungsisomeren von 2-Desoxy-galaktosyl-glycerin

Ringform	Bindungstyp	Perjodatverbrauch [Mol/Mol]	entstandener Formaldehyd [Mol/Mol]
Furanose	(1→1)	2	2
	(1→2)	1	0
Pyranose	(1→1)	2	1
	(1→2)	1	0
Septanose	(1→1)	3	1
	(1→2)	2	0

von 4 Stdn. Danach folgt, ähnlich wie bei Desoxyrohrzucker (S.36), in den nächsten 20 Stdn. nur noch eine geringe Zunahme, die aufgrund dessen als Nebenreaktion im Sinne einer Überoxydation vernachlässigt werden kann.

Wie Tab. 16 zeigt, ist die Reduktion von 2 Mol Perjodat bei gleichzeitiger Entstehung von 1 Mol Formaldehyd in Bestätigung der vorausgehenden Ergebnisse nur mit einer Struktur vereinbar, in welcher der Desoxygalaktosylrest in Pyranoseform vorliegt und die Bindung an einer primären Alkoholgruppe des Glycerinanteils lokalisiert ist.

Das gefundene $[\alpha]_D^{20}$ von -21° beweist bei der gesicherten Zugehörigkeit der Desoxygalaktose zur *D*-Reihe eine ß-glykosidische Bindung. Für das α-Anomer errechnet sich ein $[\alpha]_D$ von +153 bzw. $+155^\circ$ +).

Nach den Ergebnissen der Bausteinanalyse und Perjodatoxydation sowie der gefundenen spezifischen Drehung besitzt Verbindung B_3 die Struktur: 2-Desoxy-ß-*D*-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin.

Die Frage nach der Konfiguration des Glycerinanteils, der durch die Substitution optisch aktiv wird, bleibt noch offen, da sie nur mittels synthetisch dargestellter

---

+) Die Berechnung erfolgte wie in Tab.12, S.48 angegeben. Folgende $[\alpha]_D$ -Werte wurden verwendet: α-*D*-Galaktopyranosyl-(1→1)-*D*- und -*L*-glycerin +155 und $+159^\circ$(54), O-Methyl-α-*D*-galaktopyranosid $+179^\circ$, O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-galaktopyranosid $+170^\circ$(49).
Eine entsprechende Berechnung der spezifischen Drehung von 2-Desoxy-ß-*D*-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin ist derzeit nicht möglich, da für O-Methyl-2-desoxy-ß-*D*-galaktopyranosid noch kein exaktes $[\alpha]_D$ bekannt ist.

Substanzen durch Vergleich von Schmelzpunkt und Infrarotspektrum zu lösen wäre (vgl. l. c. 54). Die Unterschiede im $[\alpha]_J$ sind gering und daher zur Unterscheidung nicht geeignet (54).

Es sei noch vermerkt, daß in Meerrettich- und Tabakblättern auch nach Verabfolgung von 2-Desoxy-D-glucose in geringer Menge eine Verbindung nachweisbar ist, die aufgrund ihrer Elutionsgeschwindigkeit von der Kohle-Celite-Säule und ihrem $R_{Desoxyrohrzucker}$-Wert bei Papierchromatographie in Fließmittel a mit Verbindung B_3 identisch ist.

Diskussion

In den vorgelegten Untersuchungen wurden nach Verabfolgung von 2-Desoxy-hexosen an Pflanzen 20 desoxyzuckerhaltige Verbindungen gefunden, die nach dem Verhalten auf der Kohle-Celite-Säule und der papierchromatographischen Wanderungsgeschwindigkeit niedermolekulare Glykoside und Oligosaccharide darstellen. Drei davon enthalten im Molekül eine Ketose, die übrigen erwiesen sich als ketosenfrei. Zwei Isolierung konnten durch Strukturaufklärung 2-Desoxy-saccharose, 2'-Desoxy-maltose, wohl 2,2'-Didesoxy-glucobiose und 2-Desoxy-3-O-galaktopyranosyl-(1-1)-glycerin identifiziert werden.

Die Vielfalt wie auch die zur Teil nicht geringen Mengen der gefundenen Verbindungen überraschen zunächst, werden aber verständlich, wenn man bedenkt, daß 2-Desoxy-D-glucose-6-phosphat weder durch Glucose-6-phosphat-Isomerase noch durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase umgesetzt wird (1, 55), wodurch die Desoxyzucker nicht wie Hexosen dem Abbau anheimfallen sondern in die Synthesewege des Stoffwechsels gedrängt werden.

Das Auftreten von 2-Desoxy-rohrzucker, 2'-Desoxy-maltose und der Didesoxyglucobiose B_1 nach Verfütterung von Desoxy-galaktose sowie die Nachweisbarkeit von Desoxy-galaktosylglycerin nach Verabfolgung von Desoxyglucose

sind weitere Beweise für die Umwandlungsmöglichkeit der Desoxyhexosen ineinander, die nach unseren früheren Untersuchungen (14) auf dem LELOIR-Weg erfolgt.

Von den durch andere Untersucher in ähnlichen Pflanzenversuchen gefundenen Disacchariden 6-O-[ß-*D*-Fructofuranosyl]-2-desoxy-*D*-glucose (32) und 6-O-[ß-*D*-Glucopyranosyl]-2-desoxy-*D*-glucose (15) unterscheiden sich die von uns identifizierten Verbindungen ganz wesentlich dadurch, daß der Desoxyzucker stets glykosidisch gebunden ist und sich in aus dem Pflanzenstoffwechsel bekannten Sacchariden anstelle der natürlichen Hexose strukturgerecht eingebaut findet.

Desoxyrohrzucker konnten wir in Rohnen-, Meerrettich-, Tabak-, Gurken- und Kürbispflanzen nachweisen, wobei er stets an Konzentration die übrigen desoxyzuckerhaltigen Saccharide übertraf und etwa in gleichen Mengen wie Rohrzucker vorhanden war. Eine tschechische Arbeitsgruppe isolierte Desoxyrohrzucker kürzlich aus Erbsenkeimlingen und bestätigte dabei auch die von uns gefundene spezifische Drehung (16).

Die Nachweisbarkeit von Desoxyrohrzucker in allen daraufhin untersuchten Pflanzen stimmt mit dem ubiquitären Vorkommen des Rohrzuckers im Pflanzenreich überein, wo er als solcher oder in Form galaktosehaltiger Derivate (11e) in Blättern, Samen und Rhizomen als Reservekohlenhydrat dient und als Bestandteil des Siebröhrensaftes wesentlich in den Transport der Assimilate eingeschaltet ist (11f).

Dementsprechend war auch Desoxyrohrzucker in Blättern, Stengeln, Blüten (Abb.19 und 20) und Wurzeln nachweisbar.

In Abb.19 läßt das Auftreten von Desoxyrohrzucker in der Triebspitze bei kaum nachweisbaren Mengen an freien Desoxyhexosen und Desoxyhexosephosphaten einen Transport aus den größeren gut assimilierenden Blättern in die oberen im Wachstum begriffenen Anteile vermuten.

Für die Biosynthese des Desoxyrohrzuckers sind theoretisch drei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: Fructofuranosylübertragung aus Rohrzucker auf Desoxyglucose mittels β-Fructofuranosidase (56), Desoxyglucosylübertragung aus 2-Desoxy-glucose-1-phosphat auf Fructose durch Rohrzuckerphosphorylase (57)[+)] und schließlich, der Rohrzuckersynthese in der Pflanze entsprechend (30), Desoxyglucosylübertragung aus UDP-2-Desoxy-glucose auf Fructose oder Fructose-6-phosphat durch die Rohrzuckersynthetasen.

Die erste Möglichkeit ergibt sich aus Untersuchungen an der β-*D*-Fructofuranosidase von Fadenpilzen, die bei Inkubation mit Rohrzucker und ^{14}C-Glucose im Glucoseanteil markierten Rohrzucker bildet (56):

α-Glucopyranosyl-β-fructofuranosid + ^{14}C-Glucose $\rightleftharpoons$
α-[^{14}C]-Glucopyranosyl-β-fructofuranosid + Glucose

Die pflanzlichen Invertasen sind jedoch ähnlich dem Hefeferment (56) zu dieser Reaktion nur in so geringem Ausmaß befähigt (102), daß eine Entstehung des Desoxyrohrzuckers auf diesem Weg ausgeschlossen werden kann.

[+)] Nach neuerer Nomenklatur: Rohrzucker-Glucosyltransferase oder Disaccharid-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.7).

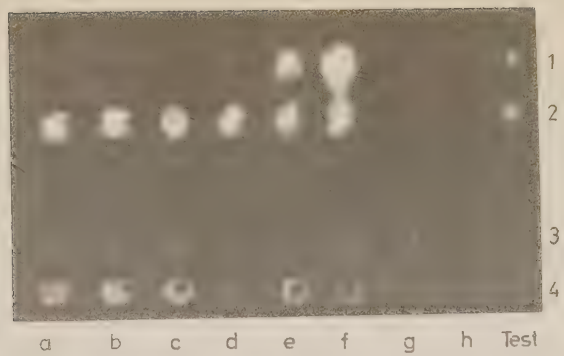


Abb. 20: Quetschpräparate[+)] aus Blättern (a), Blüte (b) und unbeblättertem Stengel (c) von Nicotiana tabacum nach Inkubation mit 2-Desoxy-*D*-glucose. 1) Verbindungen der Gruppe A, 2) 2-Desoxy-glucose, 3) 2-Desoxy-galaktose, 4) 2-Desoxy-rohrzucker, 5) 2-Desoxy-hexosenphosphate. Dünnschichtchromatographie in System 2, Anfärbung: 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens.

[+)] vgl. Methoden, S.88

Die zweite Reaktion:

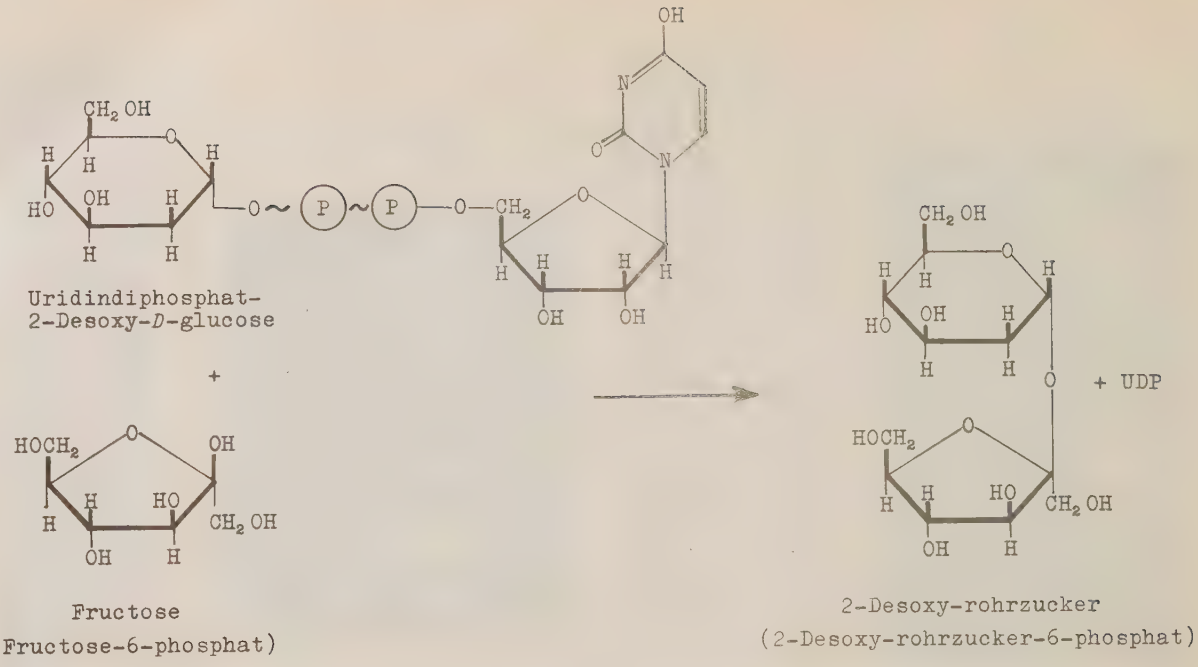
α -*D*-Glucose-1-phosphat + Fructose ⇌

Rohrzucker + Orthophosphat

wurde in Pseudomonasarten nachgewiesen (57). Die Gleichgewichtskonstante liegt mit 0,053 so weit auf seiten der Ausgangsprodukte, daß die biologische Funktion der Rohrzuckerphosphorylase mehr im Abbau als in der Bildung von Rohrzucker liegt. Auch diese Reaktion scheidet für die Biosynthese des Desoxyrohrzuckers aus, da Rohrzuckerphosphorylasen in Pflanzen nicht nachgewiesen werden konnten (58) und zudem das hierzu erforderliche Desoxyglucose-1-phosphat in pflanzlichen Zellen nur in Spuren erscheint (14).

Somit bleibt nur die in Schema 7 dargestellte Übertragung der 2-Desoxy-glucose aus dem Nucleotidverband durch die im Pflanzenreich weit verbreiteten Rohrzuckersynthetasen. Die als Glykosyldonator notwendige UDP-2-Desoxy-*D*-glucose war in all unseren Pflanzenversuchen in gut nachweisbaren Mengen vorhanden (14). Angesichts der nicht geringen Konzentration an Desoxyrohrzucker kommt dieser Reaktion auch aus energetischen Gründen die größte Wahrscheinlichkeit zu, da hier das Gleichgewicht auf seiten des Syntheseproduktes liegt (30).

Offen bleibt, ob die Desoxyglucose auf Fructose oder Fructose-6-phosphat übertragen wird. Anhaltspunkte für den zweiten Weg bestehen insofern, als man nach Behandlung der aus den Pflanzenversuchen gewonnenen "Desoxyhexosephosphat"-Fraktion mit alkalischer Phosphatase eine Verbindung findet, die dünnschichtchromatographisch wie Desoxyrohrzucker wandert (34).



Schema 7: Zur Bildung von 2-Desoxy-rohrzucker mittels Desoxyglucosylübertragung aus UDP-2-Desoxy-*D*-glucose durch die pflanzlichen Rohrzuckersynthetasen.

[illegible] Oligosaccharide C_4 [illegible] wurden noch nicht isoliert, [illegible] nur in Meerrettich-, [illegible] gebildet [illegible] papierchromatographisch [illegible]

[illegible]

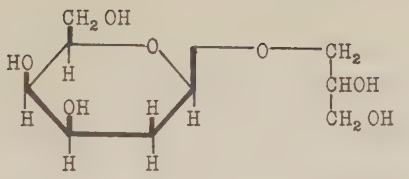
[illegible] wende Didesoxyglucobiose B_{2a} bleibt die Identität mit [illegible] prüfen (Tab. 3, S.19). B_1 kommt stets in geringerer Konzentration als C_1 vor. Am wenigsten wird von B_{2a} gebildet, was offenbar auch die Ursache dafür ist, daß diese Ver- [illegible] wird.

[illegible] (C_1) ist interessant, da Maltose in grünen Pflanzenteilen wegen ihrer geringen Konzentration erst jüngst mit [illegible] konnte (59). Offensichtlich fällt die bei der Stärkespaltung frei werdende Maltose rasch dem Abbau durch [illegible]

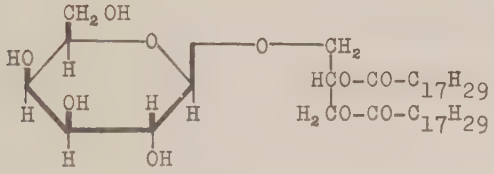
Für die Bildung der α(1→4)-Bindung in Glucobiosen sind aus dem Pflanzenstoffwechsel zwei Fermente bekannt, die Stärke- (60) und die Phytoglykogen-Synthetase (61). Erstere überträgt den Glucopyranosylrest aus UDP-Glucose, wirksamer aus ADP-Glucose, letztere nur aus ADP-Glucose. Die Übertragung erfolgt auf Maltose, höhere Homologe der Maltosereihe und die entsprechenden Glucane. Die in 2'-Desoxymaltose nachgewiesene α(1→4)-Bindung läßt für die Entstehung derselben eine Desoxyglucosylübertragung aus dem Nucleotidverband durch eines der beiden Fermente vermuten. Da jedoch für beide Fermente Glucose als Acceptor unwirksam ist, muß gefolgert werden, daß die Desoxyglucose primär in höhere Oligosaccharide oder Glucane eingebaut wird, aus denen dann 2'-Desoxy-maltose durch die in Pflanzenorganen weit verbreitete Amylase freigesetzt werden müßte.

Für die hinsichtlich ihrer Struktur noch nicht endgültig geklärten 2,2'-Didesoxy-glucobiosen ist ein ähnlicher Entstehungsweg anzunehmen. Falls sich die für die Didesoxyglucobiose B_1 vermutbare α(1→4)-Bindung bestätigt, würden die pflanzlichen α-Glucan-Synthetasen nicht nur den Desoxyzucker aus dem Nucleotidverband übertragen, sondern auch endständige Desoxyglucosylreste als Acceptor benutzen. Als Folge hiervon müßte dann die Amylase im Gegensatz zu Maltase zur Spaltung desoxyglucosidischer Bindungen befähigt sein.

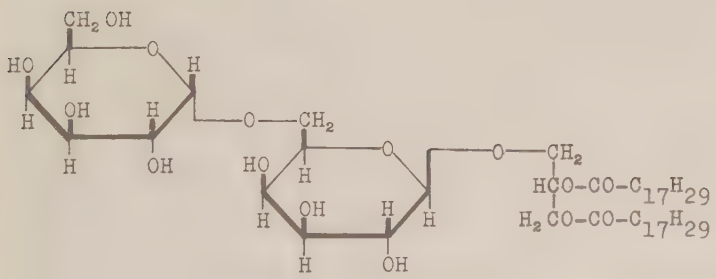
Verbindung B_3 wurde als 2-Desoxy-ß-*D*-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin (VII) identifiziert. Das natürliche Analogon wurde, um eine Galaktosyleinheit verlängert, in Form von



(VII) 2-Desoxy-β-*D*-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin



(VIII) 1-O-[β-*D*-Galaktopyranosyl]-2,3-dilinolenyl-*D*-glycerin



(IX) O-α-*D*-Galaktopyranosyl-(1→6)-O-β-*D*-galaktopyranosyl-
(1→1)-2,3-dilinolenyl-*D*-glycerin

O-α-*D*-Galaktopyranosyl-(1→6)-O-ß-*D*-galaktopyranosyl-(1→1)-*D*-glycerin aus Rotalgen isoliert (54, 62) und als Bestandteil der beiden Diglyceride (VIII) und (IX) ursprünglich in Weizenmehl (63), späterhin in allen daraufhin untersuchten Pflanzen gefunden (vgl. l.c. 64).

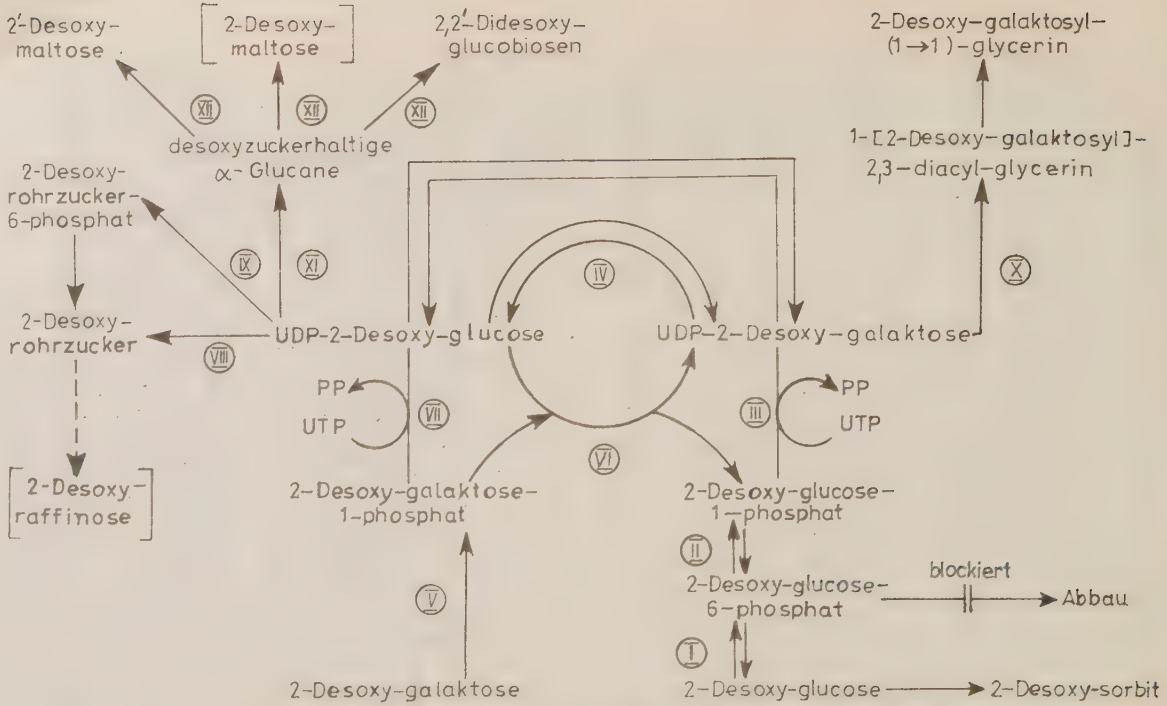
Die Galaktosyldiglyceride (VIII, IX) stellen den Hauptanteil der Lipide in Chromatophoren und Chloroplasten (65) und enthalten dort im wesentlichen die dreifach ungesättigte Linolensäure(66). Aufgrund ihres amphophilen Charakters nimmt man eine Beteiligung am Aufbau der Chloroplastenmembran an (67), wobei sie möglicherweise den Zuckertransport in das umgebende Cytoplasma bewerkstelligen, da nach Versuchen mit $^{14}CO_2$ ihr Zuckeranteil einem wesentlich rascheren Umsatz als der Diglyceridanteil unterworfen ist (68). Die Biosynthese erfolgt durch Galaktosylübertragung aus UDP-Galaktose auf einen in den Chloroplasten enthaltenen endogenen Acceptor, wobei chloroformlösliche acylierte Verbindungen entstehen (69). Unter Berücksichtigung der erwähnten Markierungsversuche ist als Acceptor das Diglycerid zu vermuten (vgl. l.c.68).

Da Verbindung B_3 in Ringgröße, Anomerieform und Bindungsstelle mit dem natürlichen Analogon vollkommen übereinstimmt, wird postuliert, daß die entsprechende UDP-Galaktose-Galaktosyltransferase aus UDP-2-Desoxy-*D*-glaktose den Desoxyzucker auf den Acceptor überträgt und B_3 aus dem so entstandenen Desoxygalaktosyldiglycerid durch die in Pflanzen nachgewiesenen Galaktolipid-Lipasen (70)

freigesetzt wird (vgl. l.c.69). Parallelen zwischen dem postulierten Glykosyldonator und der Saccharidmenge bestehen insofern als man bei Verabfolgung von 2-Desoxy-galaktose, wonach B_3 in größerer Menge auftritt, vorwiegend UDP-2-Desoxy-galaktose findet, während in Versuchen mit Desoxyglucose UDP-2-Desoxy-glucose überwiegt (14).

In Schema 8 sind die in Pflanzen gefundenen und wahrscheinlich gemachten desoxyzuckerhaltigen Verbindungen samt den zu ihnen führenden Fermentreaktionen zusammengestellt. Man erkennt, daß die verabfolgten 2-Desoxy-hexosen auf weite Strecken hin die Synthesereaktionen wie normale Zucker durchlaufen und somit zahlreiche Zwischenstufen des normalen Hexosenstoffwechsels reproduzieren.

Das gegebene Schema wird sich noch beträchtlich erweitern, wenn die 14 bisher noch nicht näher untersuchten Verbindungen hinsichtlich ihrer Struktur geklärt sind. So läßt der postulierte Biosyntheseweg der 2'-Desoxy-maltose desoxyzuckerhaltige höhere Homologe der Maltosereihe erwarten. Falls sich die ketosehaltigen Oligosaccharide C_1 und C_5 als Desoxyderivate der Raffinose erweisen, ist entsprechend der Abspaltbarkeit des Fructosylrestes aus Raffinose durch Invertase mit dem Auftreten von desoxyzuckerhaltiger Melibiose (6-O-α-D-Galaktopyranosyl-D-glucose) zu rechnen. Wie die Formeln der natürlich vorkommenden Galaktosylglycerinverbindungen [illegible] zeigen, darf man neben Desoxygalaktosylglycerin auch das Auftreten eines desoxyzuckerhaltigen Digalaktosylglycerins vermuten. Auf neue, wenn nicht näher faßbare Substanzen weist schließlich das 2-Desoxy-glucosid A_2 hin.



Schema 8: Umsetzungsmöglichkeiten der 2-Desoxy-*D*-hexosen durch Fermente des Pflanzenstoffwechsels. Für die an den Reaktionen beteiligten Fermente (I - XII) vgl. Text.

Auch für die Umsetzung der 2-Desoxy-hexosen in Bakterien läßt sich bereits ein ähnliches Schema entwerfen. In Streptococcus faecalis fanden wir in der dort als Reservekohlenhydrat dienenden Glucotriose 3-O-α-D-Glucopyranosyl-6-O-α-D-glucopyranosyl-α-D-glucopyranosid (43, 71) eine oder beide der außenständigen Glucopyranosyleinheiten durch 2-Desoxy-D-glucose ersetzt (72). Da in diesen Versuchen 2-Desoxy-D-galaktose verabfolgt worden war, muß diese auf dem LELOIR-Weg in 2-Desoxy-D-glucose umgewandelt worden sein, die dann wiederum völlig strukturgerecht durch die entsprechende Oligosaccharidsynthetase eingebaut wurde.

Aus den Reaktionsabläufen in Schema 8 ergibt sich die bemerkenswerte Tatsache, daß bei einer überaus breiten Spezifität von Fermenten des intermediären Hexosenstoffwechsels die Hydroxylgruppe an C-2 für das Zustandekommen der Ferment-Substrat-Bindung keine Rolle spielt. Hierher gehören Hexokinase (I)*, Phosphoglucomutase (II), UTP:

1-phosphat-Uridylyltransferase (VI), UTP:Galaktose-1-

IX), UDP-Galaktose: 2,3-Diacyl-glycerin-Galaktosyltrans-

tasen (XI) und Amylase (XII).

---

* Die [illegible] in Schema 8.

Für die an der Umwandlung 2-Desoxy-glucose⇌2-Desoxy-galaktose beteiligten Fermente (I-VII) wurde diese Tatsache an Saccharomyces cereviseae (12, 13), Streptococcus faecalis (17), Dactylium dendroides (18) und allen geprüften höheren Pflanzen (14, 15) gezeigt, woraus auf eine nahe Verwandtschaft dieser Fermente hinsichtlich der Ferment-Substrat-Bindung bei den verschiedenen Lebewesen geschlossen werden kann.

Im Gegensatz zu der oben genannten Fermentgruppe steht die Maltase bei der nach der von GOTTSCHALK entwickelten Vorstellung die Bindung des Substrates an das Ferment über die zum glykosidischen Sauerstoffatom in cis-Stellung befindlichen Hydroxylgruppen an C-2, C-4 und C-6 des Glucosylanteils zustandekommt (73). Unsere diesbezüglichen Untersuchungen an 2'-Desoxy-maltose unterstreichen die Notwendigkeit der Hydroxylgruppe an C-2.

Die in dieser Arbeit erstmals gelungene Darstellung von 2-Desoxyderivaten natürlicher Saccharide bietet nunmehr die Möglichkeit auch weitere Oligosaccharidhydrolasen, z.B. die verschiedenen Maltasen der Dünndarmschleimhaut sowie ß-Galaktosidasen hinsichtlich der an C-2 erforderlichen Gruppierung zu prüfen.

Die Untersuchungen am LELOIR-Weg ließen erkennen, daß die desoxyzuckerhaltigen Zwischenprodukte infolge der α -Methylengruppe spezifisch angefärbt und damit aus den oft schwer trennbaren Gemischen normaler Zwischenprodukte herausgehoben werden können. Es gelingt dadurch relativ

leicht, die genannte Reaktionskette ohne den mühsamen Nachweis von Einzelfermenten in sämtlichen Reaktionsschritten zu fassen.

Die vorgelegten Untersuchungen zeigen, daß sich darüberhinaus das Schicksal der Hexosen mit Hilfe ihrer 2-Desoxyderivate bis in die Oligo- und Polysaccharide hinein verfolgen läßt. Derartige Untersuchungen waren bisher nur mit ^{14}C-markierten Verbindungen möglich. Diesem Verfahren gegenüber bietet die Markierung durch die α-Methylengruppe den Vorteil, daß die 2-Desoxy-hexosen nicht abgebaut werden, wodurch schwer deutbare Ummarkierungsergebnisse vermieden werden und eine gezielte Untersuchung der Synthesewege ermöglicht wird. Als weiterer Vorteil kommt - wie am Beispiel der 2'-Desoxy-maltose gezeigt - die Anreicherung sonst schwer faßbarer Zwischenprodukte hinzu.

Zusammenfassung

1. Nach Verabfolgung von 2-Desoxy-*D*-glucose oder 2-Desoxy-*D*-galaktose an höhere Pflanzen wurden rund 20 desoxyzuckerhaltige Verbindungen nachgewiesen, die nach Fraktionierung der Pflanzenextrakte über Kohle-Celite-Säulen papierchromatographisch unterscheidbar sind. Unabhängig davon, welcher der beiden Desoxyzucker verabfolgt wurde, treten im wesentlichen dieselben Verbindungen auf. Mengenmäßige Unterschiede gehen dahin, daß jeweils diejenigen Verbindungen überwiegen, die den verabfolgten Desoxyzucker im Molekül enthalten.
6 Verbindungen wurden isoliert und auf ihre Struktur untersucht.

2. Die in sämtlichen Pflanzen in größter Konzentration gefundene Verbindung erweist sich als nicht reduzierend. Bei milder Säurehydrolyse werden ohne Auftreten von Zwischenverbindungen äquimolare Mengen von 2-Desoxy-*D*-glucose und *D*-Fructose gefunden. Die rasche Spaltbarkeit durch Invertase spricht für ein ß-*D*-Fructofuranosid, der charakteristische Ausfall der KAYBINschen Probe zeigt die nahe Strukturverwandtschaft zu Rohrzucker an. Ein Verbrauch von 2 Mol Perjodat/Mol, der Nachweis von 1 Mol Malonaldehyd nach Hydrolyse des Oxydationsproduktes sowie die ausbleibende Bildung von Formaldehyd beweisen für den Desoxy-glucosylrest Pyranose-, für den Fructosylrest Furanosekonfiguration. Das $[\alpha]_D$ $+45^{\circ}\pm1^{\circ}$ zeigt, daß der erstere in α-, der letztere in ß-Bindung vorliegt. Das Disaccharid ist als 2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl-ß-*D*-fructofuranosid charakterisiert und stellt somit das 2-Desoxyderivat des Rohrzuckers dar.

3. Verbindung C_1, gleichfalls in allen Pflanzen nachweisbar, ist reduzierend und liefert bei milder Säurehydrolyse äquimolare Mengen an 2-Desoxy-*D*-glucose und *D*-Glucose.

Nach Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließender Hydrolyse wird Glucose vermißt, 2-Desoxy-glucose hingegen in theoretischer Menge wiedergefunden. Dadurch ist die Verbindung als Disaccharid und Glucose als reduzierendes Molekülende erkannt. Nach Perjodatoxydation, Reduktion des Oxydationsproduktes und anschließender Hydrolyse findet sich Glycerin und Erythrit, was für einen Pyranosering im Desoxyglucosylanteil und gleichzeitig für eine (1→4)-Bindung spricht. Das $[\alpha]_D$ +125° bis 130° beweist ein α-Glykosid. Das Disaccharid besitzt demnach die Struktur 2-Desoxy-α-*D*-glucopyranosyl-*D*-glucose und kann als 2'-Desoxy-maltose betrachtet werden.
Gelegentlich scheint daneben in geringer Menge auch die stellungsisomere 2-Desoxy-maltose vorzukommen.

4. Verbindung B_1, wiederum in allen Versuchen gefunden, reduziert wie Verbindung C_1, zeigt aber nach Säurehydrolyse als einzigen Bestandteil 2-Desoxy-*D*-glucose. Nach Reduktion mit Borhydrid und anschließender Hydrolyse wird nur die Hälfte des Desoxyzuckers wiedergefunden und gleichzeitig 2-Desoxy-sorbit nachweisbar, was die Verbindung als 2,2'-Didesoxy-glucobiose charakterisiert. Das $[\alpha]_D$ +116° bis +122° beweist ein α-Glykosid. Vorläufige Ergebnisse der Perjodatoxydation schließen eine (1→6)-Bindung aus, lassen aber noch nicht zwischen (1→4)- und (1→3)-Bindung unterscheiden.

5. Bei Verbindung B_{2a}, die bislang nach Verabfolgung von 2-Desoxy-*D*-galaktose nicht gefunden wurde, scheint es sich gleichfalls um eine reduzierende 2,2'-Didesoxy-glucobiose zu handeln, wobei das chromatographische Verhalten auf eine (1→6)-Bindung hindeutet.

6. Verbindung A_2, die in allen untersuchten Pflanzen auftrat, wurde durch vorläufige Untersuchung als nicht reduzierendes, säurelabiles 2-Desoxy-glucosid charakterisiert. Die Struktur des Aglykons, für welches 2-Desoxy-hexosen, Zucker, Polyole und Inosit ausgeschlossen wurden, bleibt vorderhand offen.

7. Verbindung B_3 wurde in größerer Menge nur nach Verabfolgung von 2-Desoxy-*D*-galaktose gefunden. Die Verbindung, die nicht reduziert, ist aus äquimolaren Mengen von 2-Desoxy-*D*-galaktose und Glycerin aufgebaut. Die Ergebnisse der Perjodatoxydation - ein Verbrauch von 2 Mol Perjodat/Mol B_3 unter gleichzeitiger Entstehung von 1 Mol Formaldehyd sowie von 1 Mol Malonaldehyd nach Hydrolyse des Oxydationsproduktes - lassen für den Desoxygalaktosylanteil nur den Pyranosering zu und schließen als Bindungsstelle am Glycerin dessen sekundäre Alkoholgruppe aus. Das $[\alpha]$ -21° beweist eine ß-glykosidische Bindung. Die gefundene Struktur 1-O-[2-Desoxy-ß-*D*-galaktopyranosyl]-glycerin erhellt die Analogie zu dem in pflanzlichen Glykolipiden weit verbreiteten 1-O-[ß-*D*-Galaktopyranosyl]--*D*-glycerin.

8. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß die 2-Desoxyhexosen, obwohl sie in der Natur praktisch nicht vorkommen, im Pflanzenstoffwechsel anstelle normaler Hexosen strukturgerecht in natürlich vorkommende Oligosaccharide, Glykolipide und wahrscheinlich auch in Heteroside und Polysaccharide eingebaut werden.

   Der strukturgerechte Einbau und die in allen Fällen nachgewiesene desoxyglykosidische Bindung lassen als Syntheseweg nur die Übertragung der 2-Desoxy-hexosen aus dem Nucleotidverband zu.

   Daraus folgt, daß bei zahlreichen Saccharidsynthetasen und anderen Fermenten des Hexosenstoffwechsels die Hydroxylgruppe an C-2 für das Zustandekommen der Ferment-Substratbindung keine Rolle spielt.

   Der Einbau von 2-Desoxy-*D*-glucose und 2-Desoxy-*D*-galaktose in natürlich vorkommende Saccharide läßt die aufgrund ihrer α-Methylengruppe leicht und spezifisch nachweisbaren 2-Desoxy-hexosen als gut brauchbare Markierungssubstanzen zur Aufklärung und Verfolgung von Biosynthesewegen erscheinen.

Methodischer Teil

Pflanzenversuche

Pflanzenmaterial

Die Feuerbohnen für Versuch 1 wurden im Januar 1965 im Warmhaus bei 25-28° gezogen. Die Pflanzen wurden täglich zwischen 7 und 19 Uhr mit Leuchtstoffröhren Osram tBZ,L, 65W/32 belichtet. 11 Tage nach der Aussaat hatten die Pflanzen die ersten Blätter und konnten in den Versuch genommen werden.

Gurken- und Kürbispflanzen für orientierende Versuche wurden unter denselben Bedingungen gezogen und 3-4 Wochen nach der Aussaat zur Inkubation verwendet.

Die Meerrettich- und Tabakpflanzen für die Versuche 2-5 wurden im September 1965 im Freiland geerntet.

Die Tabakpflanzen für Versuch 6 wurden Ende August 1965 eingetopft und im Warmhaus unter ähnlichen Bedingungen wie die Bohnenpflanzen gehalten. Das anfangs mangelhafte Gedeihen wurde durch Senken der Raumtemperatur [illegible] und der nächtlichen Dunkelperiode auf 15-17° und durch intensivere Belichtung unter zusätzlicher Verwendung von Fluora-Leuchtstoffröhren (Osram) überwunden. Die Pflanzen waren im Januar 1966, als sie in den Versuch genommen wurden, kräftig entwickelt, hatten eine Höhe von 100 - 120 cm und zeigten reiche Blüte.

Die Gurkenpflanzen von Versuch 7 wurden Ende Dezember 1965 ausgesät und unter den verbesserten Bedingungen von Versuch 6 gehalten. Die Pflanzen, die Blüte und späterhin Fruchtansatz zeigten, wurden nach 5 - 10 Wochen in den Versuch genommen.

Inkubation

Die Desoxyzucker wurden in wäßr. Lösung ohne Salzzusatz verabfolgt und von den Pflanzen über die Blattstiele oder Triebstengel aufgenommen. Bei Inkubation ganzer Pflanzen fand sich der Desoxyzucker zwar reichlich in den Wurzeln, kaum aber in den Blättern. Die Inkubation von Einzelblättern ergab bei größeren Pflanzen die beste Ausbeute.

Während der Inkubation wurde durchgehend mit einfachen Glühbirnen oder Leuchtstoffröhren beleuchtet. Die Temperatur wurde zwischen 15-20°, die Luftfeuchtigkeit bei 70-80% gehalten.

Um eine ausreichende Belichtung zu erzielen, wurden die Blätter nebeneinander in flache, ca 80 cm lange Chromatographietröge gestellt und durch seitlich angebrachte Leitern in leicht geneigter Lage gehalten.

Die Pflanzen begannen zwischen 16 und 20 Stdn. zu welken, weshalb anfänglich nur 24-29 Stdn. inkubiert wurde. In den späteren Versuchen wurde die Inkubationsdauer verlängert (Tab. 1, S.10), da trotz des Welkens eine Zunahme der desoxyzuckerhaltigen Verbindungen festgestellt werden konnte.

Quetschpräparate

Die Aufnahme der Desoxyzucker und der Einbau in Oligosaccharide wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Hierzu wurde ein 5 - 10 mm^3 großes Blatt-, Blüten- oder Stengelstück auf einem Objektträger mit der Kante eines Deckgläschens zerquetscht. Der mit Hilfe des Deckgläschens abgepreßte Pflanzensaft wurde unmittelbar zur Chromatographie verwendet.

Extraktion der Pflanzen und Reinigung der Extrakte

Die Aufarbeitung erfolgte unmittelbar nach Beendigung der Inkubation. Das Pflanzenmaterial wurde durch Abspritzen mit Wasser von anhaftender Inkubationsflüssigkeit befreit, grob zerstückelt, dann mit kaltem 97proz. Äthanol (600ml/100g Feuchtgewicht) im Starmix gründlich zerkleinert und 24-48 Stdn. bei -20° belassen. Nach Absaugen des schwarzgrünen Extraktes mit Hilfe eines Büchner-Trichters wurde der Rückstand in 80proz. Äthanol erneut im Starmix zerkleinert, der Extrakt wieder abgesaugt und dieser Vorgang so lange wiederholt, bis der Extrakt farblos wurde.

Der Rückstand wurde zur Kontrolle mit Wasser extrahiert. Im eingeengten wäßr. Extrakt fanden sich bei dünnschichtchromatographischer Prüfung weder Desoxyhexosen noch desoxyzuckerhaltige Oligosaccharide.

Die vereinigten äthanolischen Extrakte wurden zur Entfärbung mit Darco G50 (15g/Liter) versetzt und 30 Min. gerührt. Die Kohle wurde durch Filtration entfernt und zweimal mit 85proz.Äthanol nachgewaschen. Das klare farblose Filtrat wurde im Vakuumrotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 30-35° auf etwa 1/20 des ursprünglichen Volumens eingeengt. Der eingeengte Extrakt aus Meerrettichblättern war rot, der aus Tabakblättern gelbbraun gefärbt.

Zur Entfernung der Fette (74) wurden je 120 ml des konzentrierten Extraktes mit 150 ml Wasser, 300 ml Methanol und 300 ml Chloroform geschüttelt. Die gelblich gefärbte organische Phase wurde abgetrennt, zweimal mit Wasser gewaschen und das Waschwasser mit der zuerst gewonnen wäßr. Phase vereinigt.

In Versuch 1 wurde die so gewonnene Lösung zur Entsalzung nacheinander mit Dowex 2 (CO_3^{--}) und Dowex 50 (H^+) behandelt, abfiltriert, eingeengt und direkt zur präparativen Papierchromatographie verwendet.

In allen übrigen Versuchen wurde ohne Entsalzung eingeengt und das Zuckergemisch über eine Kohle-Celite-Säule fraktioniert. Beim Einengen wurde mehrmals Wasser zugegeben, um das aus dem Entfettungsvorgang stammende Methanol zu entfernen.

Fraktionierung über Kohle-Celite (75).

Darco G50 und Celite 535 wurden zu gleichen Gewichtsteilen durchmischt, mit Zitratpuffer (0,2M, pH 7; 500 ml/100g), dann mit Wasser (2 Liter/100g) gewaschen und bei 80° getrocknet. Vor Gebrauch wurde das Gemisch mit Wasser zu einem dicken Brei angerührt, dieser im Vakuum entgast und in eine dem Ablauf zu mit Watte und Glaswolle abgedichtete Säule gefüllt. Die Abmessungen der in den Versuchen 4 - 7[+)] verwendeten Säulen betrugen 7x28cm. Nach mehrstündigem Durchlauf von Wasser (200 bis 250 ml/Stde.) wurde das konzentrierte Zuckergemisch aufgebracht. Anschließend wurde jeweils eluiert mit

13 l Wasser
13 l 7,5 proz. Äthanol
6 l 15proz. Äthanol
7 l 25proz. Äthanol.

In Versuch 7 wurde vor der Elution mit 7,5proz. Äthanol mit 5 l 2proz. und 7,5 l 5proz. Äthanol eluiert. Bei abschließender Kontrolle mit 40proz. Äthanol waren keine wesentlichen Zuckermengen mehr nachweisbar.

Wegen der Säurelabilität der desoxyzuckerhaltigen Verbindungen wurden die Elutionsmittel mit Ammoniak auf pH 7,2 gebracht. Trotzdem war das Eluat schwach sauer. Wie die in allen Fraktionen nachweisbaren freien Desoxyhexosen zeigen, wurde dadurch offensichtlich eine geringe Hydrolyse verursacht.

Das Eluat wurde in Versuch 4 und 5 in Fraktionen von je 250 ml, in Versuch 6 und 7 von jeweils 1500 - 2000 ml gesammelt.

Die Einzelfraktionen wurden im Vakuumrotationsverdampfer bei ca. 30° unter Neutralisieren mit Ammoniak auf 2 - 4 ml eingeengt. Beim Einengen ausgefallenes Celite wurde abfiltriert.

[+)] In den Versuchen 2 und 3 wurden entsprechend kleinere Säulen verwendet und mit etwa 1/15 der Elutionsflüssigkeiten gearbeitet.

Die eingeengten Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch in System 2 auf ihre desoxyzuckerhaltigen Bestandteile geprüft. Fraktionen ähnlicher Zusammensetzung wurden vereinigt. In Zweifelsfällen wurde vorher papierchromatographisch kontrolliert.

Die vereinigten Fraktionen wurden weiter eingeengt, nochmals filtriert und papierchromatographisch untersucht.

Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden auf Chromatographiepapier Schleicher u. Schüll 2043b durchgeführt. Es wurde bei 18° absteigend im Durchlauf chromatographiert.

Für präparative Zwecke wurde die das Zuckergemisch enthaltende Lösung in Streichauftragung (25 cm) auf normales Chromatographiepapier (2043b) gebracht und wie üblich chromatographiert. Nach Anfärben einer schmalen Randzone wurden die zuckerhaltigen Zonen ausgeschnitten, an einem Ende keilförmig zugeschnitten und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre absteigend mit Wasser eluiert. Die exakte Trennung wurde durch Anfärben der zwischen den zuckerhaltigen Zonen verbliebenen Streifen kontrolliert.

Fließmittel:

a) Äthylacetat/Pyridin/Wasser 8:2:1; 8-12 Stdn. für 2-Desoxyhexosen, 48-62 Stdn. für desoxyzuckerhaltige Disaccharide
b) Äthylacetat/Pyridin/Wasser 5:2:5 (obere Phase); 48Stdn.
c) Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser 7:1:2; 48 Stdn.
d) Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser 42:57:20; 48-72 Stdn.
e) Butanol-(1)/Pyridin/Wasser 6:4:3; 36 - 72 Stdn.
f) Butanol-(1)/Eisessig/Wasser 10:1:3; 36 Stdn.
g) Pentanol-(1)/Pyridin/Wasser 7:7:6; 36 - 48 Stdn.
h) Äthylacetat/Pyridin/Eisessig/Wasser 5:5:1:3; 24 Stdn.

Anfärbeverfahren:

I Perchlorsäure/Aceton (10)
II Vanillin/Perchlorsäure (76)
III Naphthoresorcin/Phorsphorsäure (77)
IV Harnstoff/Phosphorsäure (78)
V Anilin-hydrogenphthalat (89)
VI alkalische 3,5-Dinitrosalicylsäure (79)
VII alkalische 3,4-Dinitrobenzoesäure (80)
VIII Silbernitrat (81)

Tabelle 17: Färbungen mit Perchlorsäure/Aceton (I) und Vanillin/Perchlorsäure (II)

Geprüfte Verbindungen	Reagens I	Reagens II	
	Tageslicht	Tageslicht	UV-Licht+)
2-Desoxy-glucose	braun (0,2γ)	blauviolett (< 0,1γ)	rot (0,05γ)
2-Desoxy-galaktose	braun (0,2γ)	blauviolett (< 0,1γ)	rot (0,05γ)
2-Desoxy-ribose	braun (1γ)	blaugrau (0,5γ)	schwarzgrau (0,5γ)
Fructose	grau (5γ)	graubeige (1γ)	ocker (2γ)
Rhamnose	ocker (50γ)	orange (< 5γ)	beige (< 5γ)
Glucose (200γ/µl)	nicht gefärbt	nicht gefärbt	weiß
Maltose (200γ/µl)	nicht gefärbt	nicht gefärbt	weiß
Rohrzucker	grau (10γ)	graubeige (2γ)	ocker (5γ)
2-Desoxy-rohrzucker	schwarzviolett (0,5γ)	blauviolett (0,2γ)	rot (0,1γ)
2-Desoxy-sorbit	nicht gefärbt	rotviolett (1γ)	rotviolett (1γ)
Polyole	nicht gefärbt	blau (>10γ)	blau (5γ)

Werte in Klammern = Nachweisgrenze am nicht gelaufenen Chromatogramm, wobei die jeweilige Zuckermenge in 1 µl Wasser auf das Papier gebracht wurde.

Geprüfte Polyole: Sorbit, Dulcit und Erythrit. Inosit wird weder durch Reagens I noch durch Reagens II gefärbt.

+) λ = 366 mµ. Kurzwelliges UV-Licht λ = 254 mµ ist weniger geeignet, da hier der Untergrund dunkler erscheint und die Beurteilung der Färbung erschwert.

Tabelle 18: Färbungen mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure (III) und Harnstoff/Phosphorsäure (IV)

Geprüfte Verbindungen	Reagens III		Reagens IV	
	Tageslicht	UV λ = 366 mμ	Tageslicht	UV λ = 366 mμ
2-Desoxy-glucose	oliv (0,5γ)	grün (0,5γ)	lila (0,5γ)	hellrot (0,1γ)
2-Desoxy-galaktose	oliv (0,5γ)	grün (0,5γ)	lila (0,5γ)	hellrot (0,1γ)
2-Desoxy-ribose	oliv (0,5γ)	bräunlich	braungrau (1γ)	ocker (1γ)
Fructose	rot (0,1γ)	kirschrot (0,1γ)	blau (0,1γ)	blauviolett (0,5γ)
Rohrzucker	rot (0,2γ)	kirschrot (0,2γ)	blau (0,5γ)	blauviolett (1γ)
Raffinose	rot (0,5γ)	kirschrot (0,5γ)	blau (1γ)	blauviolett
2-Desoxy-rohrzucker	rot (0,2γ)	kirschrot (0,2γ)	rotviolett (1γ)	dunkelrot (0,2γ)
Glucose	blau (5γ)	blau (5γ)	grau (50γ)	gelbbraun (50γ)
Maltose	blau (10γ)	blau (10γ)	grünblau (50γ)	gelblich weiß (50γ)
2'-Desoxy-maltose	oliv (2γ)	grün (2γ)	lila	hellrot

Werte in Klammern = Nachweisgrenze, bestimmt wie bei Tab.17 angegeben

...d Differenzierungsmöglichkeiten ... aus Tabelle 17 und 18 her-...

...
(vgl. 2-Desoxy-rohrzucker und 2'-Desoxy-maltose).

Hexosen wurden mit Reagens V, Ketohexosen zusätzlich mit Reagens III sichtbar gemacht.

...
bzw. 0,5γ/µl) lieg..., müssen entsprechend konzentrierte Lösungen verwendet werden. Bei negativem Ausfall wurde eine zweite Probe auf dem Papier mit 1 N HCl besprüht, ... statt in 1N in 2 N NaOH angesetzt wurde. Die Hydrolyse- ... α-*D*-glucopyranosid+) ermittelt.

... verwendet. Nachweisgrenze für 2-Desoxy-hexosen 2γ/µl, für Hexosen 0,2γ/µl.

Dünnschichtchromatographie

System 1: Kieselgel G, akiviert; Äthylacetat/Propanol-(2)/Wasser 65 : 23 : 12

System 2: Kieselgel G, aktiviert; Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser 7 : 2 : 1

2 : 1 : 2 (obere Phase)

...nung zweiter Lauf in Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser (7:2:1).

+) vgl. Fußnote, S.107

Die Laufstrecke betrug 12 cm. Falls zur besseren Trennung erforderlich, wurde in System 2 und 3 zweimal mit Zwischentrocknung chromatographiert.

Anfärbung auf Kieselgel

(a) 2-Desoxy-zucker und desoxyzuckerhaltige Verbindungen wurden mit Hilfe der Chinaldinreaktion (83) durch Aufsprühen phosphorsaurer 3,5-Diamino-benzoesäure-lösung und 15-minütiges Erhitzen bei 100° sichtbar gemacht. Am Tageslicht: uncharakteristische Braunfärbung; unter der UV-Lampe (λ = 254mμ): für α-Methylenaldehyde spezifische grüngelbe Fluoreszenz (9). Nachweisgrenze für 2-Desoxy-hexosen: 0,05γ/μl.

(b) Aldosen und desoxyzuckerfreie Oligosaccharide wurden gleichfalls mit dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens gefärbt. Nach 30-minütigem Erhitzen bei 105° Braunfärbung, im UV-Licht jedoch keine Fluoreszenz. Erfassungsgrenze für Aldohexosen: 0,5γ/μl. Polyole bleiben ungefärbt.

(c) Ketohexosen wurden wie bei der Papierchromatographie mit Naphthoresorcin/Phosphorsäure (77) sichtbar gemacht.

(d) 2-Desoxy-sorbit[+]: Zur Oxydation wurden die Platten mit 0,1proz. Perjodsäurelösung besprüht und nach 5 Min. die überschüssige Perjodsäure mittels 0,5proz. Natriummetaarsenitlösung (in 0,5 N HCl) zerstört. Nach Besprühen mit dem 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagens tritt die für α-Methylenaldehyde chrakteristische Grüngelbfluoreszenz bereits bei Raumtemperatur auf.

(e) Polyole wie Glycerin, Erythrit, Pentite, Hexite wurden mit Silbernitrat nach dem von STAHL (84) für die Dünnschichtchromatographie angegebenen Verfahren sichtbar gemacht.

(f) Zur allgemeinen Prüfung auf Zucker wurde gelegentlich das Anisaldehyd-Reagens (85) verwendet. 2-Desoxyaldosen färben sich rascher als einfache Aldosen; Polyole bleiben ungefärbt.

Anfärbung auf Cellulose

Sämtliche Zucker und Polyole wurden hier ausschließlich mit Silbernitrat sichtbar gemacht. Die Platten wurden mit der für die Papierchromatographie angegebenen Silbernitratlösung (81) besprüht, 15 Min. in eine abgedunkelte, mit Ammoniak gesättigte Kammer gestellt (84) und danach etwa 20 Min. bei 100° erhitzt.

[+] Dargestellt aus 2-Desoxy-*D*-glucose nach der Vorschrift von WOLFROM u. THOMPSON (97). Schmp. 104 - 106°, Literaturwert 105 - 106° (98).

Darstellung der desoxyzuckerhaltigen Verbindungen

(1) Desoxyrohrzucker

Präparat I wurde aus den jungen mit 2-Desoxy-galaktose inkubierten Bohnenpflanzen von Versuch 1 gewonnen. Gereinigt wurde die Verbindung durch präparative Papierchromatographie des von Eiweiß, Lipiden, Farbstoffen und Salzen befreiten Pflanzenextraktes in fließmittel a, wodurch die Abtrennung der begleitenden Zucker (Abb. 2, 3,) bis auf Spuren von Glucose gelang. Letztere wurde bei Chromatographie über eine Kohle-Celite-Säule (0,8 11 cm) durch Eluieren mit Wasser entfernt. Das Disaccharid selbst wurde von der Säule mit 70proz. wäßr. Äthanol eluiert, im Eisbad aufgefangen und das Eluat auf ein entsprechendes Volumen eingeengt.

Die so gewonnene Lösung wurde zur Charakterisierung des Disaccharids verwendet. Dieses erwies sich bei Papierchromatographie in fließmittel a, f, g als einheitlich und war nach fermentativer Messung frei von Glucose, Fructose und Rohrzucker[+].

Präparat II wurde aus den mit 2-Desoxy-glucose inkubierten Meerrettichblättern von Versuch 4 dargestellt. Verwendet wurden die bei Fraktionierung des Pflanzenextraktes über die Kohle-Celite-Säule bei Elution mit Wasser erhaltenen Fraktionen 20 - 53, in denen infolge Überladung der Säule ein Teil des Disaccharids zusammen mit Rohrzucker erschien. Da die Alkalistabilität der Verbindung aus Versuch 1 bereits bekannt war, wurden die vereinigten Fraktionen zur Zerstörung der begleitenden Monosaccharide 1 Stde. in 1 N NaOH am Rückfluß gekocht. Die Lösung wurde mittels Dowex 50 (NH_4^+) von Natriumionen befreit und eingeengt.

[+] Geprüft durch Untersuchung auf Glucose im Hydrolysat mittels Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Die braungefärbten Abbauprodukte der Monosaccharide wurden zum großen Teil durch Behandlung mit Aktivkohle und durch Fällung mit 75proz. Äthanol entfernt. Ein geringer Rest blieb bei der nachfolgenden präparativen Papierchromatographie (Fließmittel a), die gleichzeitig der Abtrennung des Rohrzuckers diente, im Start. Das eluierte Disaccharid wurde über eine kleine Kohle-Celite-Säule (1·18 cm) von aus dem Papier stammenden Verunreinigungen befreit.

Für die chemischen Analysen wurde eine entsprechend konzentrierte wäßr. Lösung verwendet. Das Disaccharid war wie Präparat I chromatographisch einheitlich und frei von Hexosen und Rohrzucker.

(2) Verbindung C_1

Das Disaccharid wurde aus den Tabakblättern von Versuch 3 gewonnen. Nach Fraktionierung des Pflanzenextraktes über eine Kohle-Celite-Säule wurde die C_1-reichste Fraktion des Eluats mit Invertase behandelt, da die papierchromatographische Abtrennung von Rohrzucker und Desoxyrohrzucker für präparative Zwecke unzureichend war. Die entstandenen Monosaccharide wurden durch Chromatographie über eine kleine Kohle-Celite-Säule (0,8·10 cm) mittels Wasser entfernt. Das Disaccharid wurde aus dieser mit 10proz. Äthanol eluiert und von den invertaseresistenten Verbindungen (B_1, B_4, A_2) durch präparative Papierchromatographie in Fließmittel a befreit.

Die aus dem Papier eluierte Verbindung war chromatographisch einheitlich und nach fermentativer Messung frei von Glucose, Fructose, Rohrzucker[+)] und Desoxyrohrzucker[+)].

Ein zweites Präparat wurde aus den Meerrettichblättern von Versuch 2 auf gleiche Weise gewonnen.

[+)] Geprüft durch fermentative Untersuchung auf Fructose (vgl. S.103) im Hydrolysat.

(3) Verbindung B_1

Das Disaccharid wurde aus dem über Kohle-Celite fraktionierten Extrakt der Meerrettichblätter von Versuch 2 dargestellt. Da die Verbindung papierchromatographisch wesentlich rascher als die übrigen desoxyzuckerhaltigen Verbindungen wandert (vgl.Tab.3, S.19), erfolgte die Darstellung unmittelbar durch präparative Papierchromatographie in Fließmittel a.

Das Präparat war chromatographisch einheitlich, enthielt aber nach fermentativer Bestimmung etwa 3% Fructose. Da das Monosaccharid bei der Strukturaufklärung nicht stört, unterblieb in Anbetracht der geringen Disaccharidmenge eine weitere Reinigung über Kohle-Celite.

(4) Verbindung B_{2a}

Das Disaccharid stammt aus den Meerrettichblättern von Versuch 4. Die Darstellung erfolgte aus den Fraktionen 64 - 69 des aus der Kohle-Celite-Säule gewonnenen Eluats durch präparative Papierchromatographie in Fließmittel a. Durch weitere Chromatographie über eine kleine Kohle-Celite-Säule (0,8·10 cm) konnten noch vorhandene Monosaccharide völlig, eine bei Dünnschichtchromatographie in System 2 langsamer wandernde desoxyzuckerhaltige Verbindung (B_3) weitgehend abgetrennt werden.

(5) Verbindung A_2

Das untersuchte Präparat stammt aus den Tabakblättern von Versuch 3 und wurde bei der papierchromatographischen Reinigung von Verbindung C_1 gewonnen. Nach 12stündigem Lauf in Fließmittel a wurden die Chromatogramme getrocknet und am startfernen Ende ein ca 10 cm breiter Streifen abgeschnitten, der in der Regel die äußerst rasch wandernde Verbindung A_2 enthielt. Die eluierte Verbindung ließ bei chromatographischer Prüfung keine Verunreinigungen erkennen.

(6) Verbindung B_3

Die Verbindung wurde aus den Meerrettichblättern von Versuch 5 gewonnen. Die Darstellung erfolgte durch präparative Papierchromatographie in Fließmittel a der aus der Kohle-Celite-Säule erhaltenen Fraktionen 62 - 64. Das aus dem Papier erhaltene, eingeengte wäßr. Eluat war gelblich gefärbt. Es enthielt nach Dünnschichtchromatographie in System 1 und 2 zwar nur eine desoxyzuckerhaltige Verbindung, zeigte sich aber bei Prüfung in System 3 unter Anfärbung mit Silbernitrat mit Glucose und startnah-en, offensichtlich aus dem Papier stammenden Substanzen verunreinigt. Zur Reinigung wurde über eine Kohle-Celite-Säule (0,8 · 14 cm) chromatographiert, wobei die Glucose mit Wasser entfernt und B_3 anschließend mit 10proz. Äthanol eluiert wurde. Das farblose Eluat wurde entsprechend eingeengt und zur Charakterisierung von B_3 verwendet.

Das Präparat erwies sich bei Dünnschichtchromatographie in System 1 - 3 als einheitlich und war frei von Glucose sowie den oben erwähnten startnahen Verunreinigungen. Bei fermentativer Prüfung war weder Glucose noch Glycerin nachweisbar.

Strukturaufklärung

Zur Strukturaufklärung wurden die bei der Darstellung erhaltenen wäßr. Lösungen der gereinigten Verbindungen verwendet. Sie wurden, fest verschlossen, bei -20° aufbewahrt. Die Konzentration wurde jeweils durch Bestimmung der Bestandteile im Hydrolysat ermittelt. Alle übrigen Messungen wurden auf die hierbei gefundene mittlere Konzentration bezogen.

Säurehydrolyse zur Bestimmung der Bestandteile

(a) Zur qualitativen Prüfung:

0,01 ml Saccharidlösung (0,05 - 0,3 µMol)+) wurden mit 0,01 ml 0,2N HCl gut durchmischt, in zugeschmolzener Schmelzpunktskapillare 5 - 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und danach auf einem Uhrgläschen mit 0,2N NaOH neutralisiert. Das neutralisierte Hydrolysat wurde zur chromatographischen Identifizierung der Hydrolysenprodukte verwendet.

Unzureichende [illegible] beim Antrocknen des [illegible] bau der 2-[illegible] weil es sich um Anhydri[illegible]

(b) Zur quantitativen Bestimmung:

[illegible] wurden mit gleichen Tln. 0,2N HCl in zugeschmolzener Ampulle wie unter (a) [illegible]. Zur quantitativen Bestimmung der Hydrolysenprodukte wurden jeweils 0,1 ml des Hydrolysats je nach Empfindlichkeit des Meßverfahrens 25- bis 2000-fach verdünnt, wobei mit eingestellter Natronlauge neutralisiert wurde. Auf Vollständigkeit der Hydrolyse wurde durch Messung nach verlängerter Hydrolysendauer geprüft.

Methoden zur quantitativen Bestimmung der Saccharidbestandteile

Zur Bestimmung der Hydrolysenprodukte wurden streng spezifische Fermentreaktionen bevorzugt, da sie die bei den wenig spezifischen chemischen Reaktionen zur Messung notwendige chromatographische Trennung ersparen und gleichzeitig die sonst übliche Charakterisierung anhand kristalliner Derivate zu ersetzen vermögen. Dadurch wurde es mög-

+) Präparat II von Desoxyrohrzucker (300 µMol/ml) wurde in einer Verdünnung von 1 : 10 eingesetzt.

lich, Menge und Struktur der Bestandteile mit Saccharidmengen von weniger als 1 mg exakt zu bestimmen.

Es wurden colorimetrische Methoden und optische Tests benutzt. Die Extinktionsmessungen wurden im Spektralphotometer Zeiss M4QII durchgeführt.

Bei den colorimetrischen Methoden wurden Vergleichslösungen authent. Substanzen von bekannter Konzentration untersucht und die Konzentration der unbekannten Lösung (C_u) wie folgt berechnet:

$$(I) \quad \frac{E_u}{E_s} \cdot C_s = C_u$$

E_u und E_s = Extinktion von Untersuchungs- und Standardlösung, C_s = Konzentration der Standardlösung.

Im optischen Test diente als Bezugsgröße der Extinktionskoeffizient von DPNH bzw. TPNH (86) $\varepsilon_{340} = 6{,}22$ [$cm^2/\mu Mol$]:

$$(II) \quad \frac{\Delta E_{340} \cdot V}{6{,}22 \cdot d} = \mu Mol \text{ Substanz/Ansatz}$$

ΔE_{340} = Differenz der Extinktionen vor und nach Ablauf der Fermentreaktion, V = Volumen des Ansatzes, d = Schichtdicke (cm).

Soweit nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Fermente und Cosubstrate von der Fa. Boehringer bezogen.

(1) 2-Desoxyhexosen

Die Bestimmung erfolgte nach der Vorschrift von AUGUSTIN und HOFMANN (87) unter geringfügigen Abänderungen. Die Desoxyhexosen werden zunächst mit Perjodsäure oxydiert, wobei aus C-1 bis C-3 Malonaldehyd entsteht, der nach Zerstörung der überschüssigen Perjodsäure unter Erhitzen mit Thiobarbitursäure zu einem Farbstoff gekoppelt wird. Die Farbstoffbildung ist der Menge an Desoxyhexose über den geprüften Konzentrationsbereich (0 - 5γ/Ansatz) linear proportional.

Lösungen: Perjodsäurelösung (0,02M HJO_4 in 0,1N H_2SO_4), Arsenitlösung (0,15M $NaAsO_2$ in 0,5N HCl), Thiobarbituratlösung (1,42g Thiobarbitursäure, 7ml 0,2N NaOH, mit Wasser ad 200ml), Vergleichslösungen von 2-Desoxy-glucose bzw. 2-Desoxy-galaktose (2γ/ml).

Ausführung: 1 ml Untersuchungslösung und 0,2 ml Perjodsäurelösung in fest verschlossenen Reagensgläsern 60 Min. bei 40°. Nacheinander: 0,3 ml Arsenitlösung, 3 ml Thiobarbituratlösung. 25 Min. bei 85° erhitzen und abkühlen lassen.

Messung gegen Leerwert bei λ = 532 mμ, d = 1 cm

Anmerkung: Zur Bestimmung von 2-Desoxy-galaktose kann die Oxydation bei Zimmertemp. erfolgen und die Reaktionszeit auf 20 Min. verkürzt werden.

(2) 2-Desoxy-*D*-glucose

In Abwesenheit von *D*-Glucose ist eine spezifische Bestimmung von 2-Desoxy-*D*-glucose mittels Glucose-Oxydase (GOD) möglich (12). Der Messung liegen folgende Reaktionen zugrunde:

$$\text{2-Desoxy-}D\text{-glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{2-Desoxy-}D\text{-gluconsäure} + H_2O_2$$

Das entstandene Peroxyd wird mittels Peroxydase (POD) und einem Wasserstoffdonator (Di-o-anisidin) bestimmt:

$$\text{Di-o-anisidin} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{POD}} \text{Farbstoff} + 2H_2O$$

Im geprüften Konzentrationsbereich (0 - 45 γDesoxyglucose/Ansatz) folgt die Farbentwicklung dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Lösungen: "Glucose-Reagens" (Boehringer) = 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0, enthaltend 40γ Peroxydase/ml und 250γ Glucose-Oxydase/ml, vor Gebrauch mit 0,01 Vol. Di-o-anisidinhydrochlorid-Lösung (6,6mg/ml) versetzt; Vergleichslösung von 2-Desoxy-*D*-glucose (100γ/ml).

Ausführung: 0,2 ml Untersuchungslösung mit 5 ml Reagens 75 Min. bei 35° belassen.

Messung gegen Leerwert bei λ = 436 mμ, d = 1 cm.

(3) 2-Desoxy-*D*-galaktose

Die spezifische Bestimmung von 2-Desoxy-*D*-galaktose, die eine galaktosefreie Lösung voraussetzt, erfolgte mittels Galaktose-Oxydase (GalOD) nach der Vorschrift von FISCHER und ZAPF (88). Die Darstellung des Fermentes sowie die Bestimmung der Fermentaktivität wurde nach HORECKER u. Mitarb. durchgeführt (23). Der Messung liegt das gleiche Prinzip wie der Bestimmung der 2-Desoxy-glucose zugrunde:

$$\text{2-Desoxy-}D\text{-galaktose} + O_2 \xrightarrow{\text{GalOD}} \text{dialdo-2-Desoxy-}D\text{-galaktose} + H_2O_2$$

$$\text{o-Kresol} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{POD}} \text{Farbstoff} + 2H_2O$$

Zwischen der Konzentration an Desoxygalaktose (0-100γ/Ansatz) und der Farbentwicklung besteht Linearität.

Lösungen: Puffer-Enzym-Chromogen (0,2 M Phosphatpuffer pH 7, enthaltend 1 mg o-Kresol/ml und 400γ Peroxydase/ml), GalOD (480 E/ml), Vergleichslösung von 2-Desoxy-*D*-galaktose (50γ/ml).

Ausführung: 1 ml Untersuchungslösung, 0,1 ml Puffer-Enzym-Chromogen, 0,05 ml GalOD exakt 30 Min. bei Zimmertemperatur belassen.

Messung gegen Leerwert bei λ = 410mμ, d = 1 cm.

Da die Ablesungen bei noch laufender Reaktion erfolgen, wurden diese in späteren Versuchen zur Erhöhung der Messgenauigkeit in Abständen von exakt 5 Min. durchgeführt und die Summen der so gemessenen Extinktionen von Untersuchungslösung und Standard zu einander in Beziehung gesetzt.

(4) *D*-Glucose

Die Messung erfolgte im optischen Test nach folgenden Reaktionen:

$$D\text{-Glucose} + ATP \xrightarrow{HK} D\text{-Glucose-6-phosphat} + ADP$$

$$D\text{-Glucose-6-phosphat} + TPN \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-Phospho-}D\text{-gluconsäure} + TPNH + H^+$$

Die Bestimmung von Glucose ist nach diesem Verfahren auch in Anwesenheit von 2-Desoxy-*D*-glucose möglich, da diese zwar durch HK phosphoryliert wird, 2-Desoxyglucose-6-phosphat jedoch mit der Dehydrogenase praktisch nicht reagiert.

Lösungen: 0,3M Triäthanolaminpuffer, pH 7,5, enthaltend 0,004 M $MgSO_4$
TPN = Triphosphopyridinnucleotid, 0,012 M
ATP = Adenosintriphosphat, 0,016 M
HK + G-6-PDH = Hexokinase (1mg/ml) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (2mg/ml)

Ausführung: 2,6 ml Puffer, 0,2 ml Untersuchungslösung, 0,1 ml ATP, 0,1 ml TPN, 0,1 ml HK + G-6-PDH

Messung gegen Luft bei λ = 340mμ, d = 1 cm

Nach Ablesung der Ausgangsextinktion wird die Reaktion durch Fermentzugabe gestartet und bis zum Stillstand (6-8Min.) verfolgt.

(5) *D*-Fructose

Eine Bestimmung von Fructose in Anwesenheit von 2-Desoxyglucose ist gleichfalls nur im optischen Test möglich +). Sie erfolgt durch Zusatz von Phosphoglucose-Isomerase (PGI, 2mg/ml) zu dem unter (4) genannten Ansatz:

$$\text{Fructose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Fructose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Fructose-6-phosphat} \xrightarrow{\text{PIG}} \text{Glucose-6-phosphat}$$

$$\text{Glucose-6-phosphat} + \text{TPN} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-Phosphogluconsäure} + \text{TPN} + \text{H}^+$$

Ausführung: Dem wie in (4) zusammengesetzten Ansatz wird zunächst HK + G-6-PDH zugegeben, um eventuell vorhandene Glucose zu erfassen. Ein geringer Extinktionsanstieg (< 0,01/10Min.) ist offenbar auf die geringfügige Verunreinigung der Fermente mit Phosphoglucose-Isomerase zurückzuführen. Gegebenenfalls wird ein durch Glucose bedingter Extinktionsanstieg abgewartet und dann die Fructosemessung mittels Phosphoglucose-Isomerase gestartet.

(6) Glycerin

Die Bestimmung erfolgte im optischen Test nach der Methode von WIELAND (90). Glycerin wird durch Glycerokinase (GK) phosphoryliert und das entstandene *L*-Glycerin-1-phosphat mittels Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase (GDH) zu Dihydroxyacetonphosphat dehydriert. Zum vollständigen Ablauf wird Dihydroxyacetonphosphat als Hydrazon aus dem Gleichgewicht genommen:

$$\text{Glycerin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{Glycerinphosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerinphosphat} + \text{DPN}^+ \overset{\text{GDH}}{\rightleftharpoons} \text{Dihydroxyacetonphosphat} + \text{DPNH} + \text{H}^+$$

$$\text{Dihydroxyacetonphosphat} + \text{Hydrazin} \longrightarrow \text{Dihydroxyacetonphosphat-hydrazon}$$

Lösungen: Puffer$_2$ (Glykokoll 0,2M, Hydrazinhydrat 1M, $MgCl_2$ $2 \cdot 10^{-2}$M, mit einigen Tr. 10N KOH auf pH 9,8 eingestellt), ATP (0,05M), DPN (0,02M), GK (60E/ml), GDH (7mg/ml)

Ausführung: 1,37ml Puffer, 0,02ml GDH, 0,05ml ATP, 0,05ml DPN, 0,5 ml Untersuchungslösung, 0,02 ml GK

Messung gegen Luft bei λ = 340 mμ, d = 1 cm

Nach Konstantwerden der Ausgangsextinktion wird die Reaktion mit GK gestartet und bis zum Stillstand (20-25 Min.) verfolgt.

+) Die Messung der Fructose mit der Cystein-Schwefelsäure-Carbazol-Reaktion nach DISCHE (101) wird durch 2-Desoxyglucose empfindlich gestört und liefert dabei zu hohe Meßwerte.

Prüfung auf reduzierende Gruppen

Aufgrund der geringen Substanzmengen und der zum Teil niedrigen Konzentration in den Ausgangslösungen kam die sonst übliche Prüfung mit FEHLINGscher Lösung nicht in Frage. Statt dessen wurde das Verhalten bei drastischer Alkalibehandlung geprüft und die Reduzierbarkeit der Verbindungen durch Natriumborhydrid ($NaBH_4$) herangezogen, wobei sich mit geringen Substanzmengen exakte Aussagen gewinnen lassen.

(1) Verhalten gegen Alkali

(a) 0,2 ml Desoxyrohrzucker-Lsg. (4,4 µMol) wurden mit 0,2 ml 2N NaOH durchmischt und in zugeschmolzener Ampulle 45 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. 0,2 ml der farblos gebliebenen Lösung wurden mit 0,2 ml 2 N HCl vollständig hydrolysiert (20°, 210 Min.). Bei Messung mit der Thiobarbitursäuremethode (S.100) und Glucose-Oxydase (S.101) sowie dem UV-Test für Fructose (S.103) wurden im Hydrolysat 2-Desoxy-glucose und Fructose zu 97,8 und 95,4% des theoretischen Wertes gefunden.

Rohrzucker wurde in gleicher Weise mit Alkali behandelt, dann in 0,5N HCl bei 100° in 5 Min. hydrolysiert. Die fermentative Messung von Glucose und Fructose ergab 96% der eingesetzten Menge. Die gleiche Alkalistabilität zeigte α,α-Trehalose und eine Glucosyl-α,ß-trehalose (71).

Wurde ein Gemisch von 2-Desoxy-glucose und Fructose in 1 N NaOH erhitzt, trat sofort Braunfärbung auf und nach 10 Min. waren bei Messung mit der Thiobarbitursäuremethode (S.100) und dem UV-Test für Fructose (S.103) keine Zucker mehr nachweisbar. Grundsätzlich das gleiche Verhalten zeigte auch Maltose (71).

Der Abbau reduzierender Kohlenhydrate erfolgt in 0,1N NaOH praktisch in derselben Zeit.

(b) 0,01 ml der verschiedenen Saccharidlösungen wurden mit 0,01 ml 0,2 N NaOH in zugeschmolzener Schmelzpunktskapillare 25 - 45 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, mit 0,01 ml 0,2 N HCl neutralisiert und dünnschichtchromatographisch in System 2 untersucht.

Desoxyrohrzucker, Verbindung A_2 und Desoxygalaktosyl-(1→1)-glycerin bleiben mit dem spezifischen 3,5-Diaminobenzoesäurereagens nachweisbar; eine startwärts gerichtete Verbreiterung der Flecken ist durch die Salzkonzentration bedingt.

2'Desoxy-maltose und die beiden 2,2'-Didesoxy-glucobiosen (B_1 und B_{2a}) waren nicht mehr nachweisbar. Der Alkaliabbau zeigte sich bereits durch Braunfärbung während des Erhitzens an.

(2) Behandlung mit Natriumborhydrid

0,05 - 0,1 ml der Lösungen von Desoxyrohrzucker sowie der Verbindungen C_1 und B_1 wurden unter Eiskühlung mit jeweils gleichen Tln. 2proz. wäßr. Natriumborhydridlösung durchmischt und 12 Stdn. bei Raumtemp. belassen. Anschließend wurde mit 2 N Essigsäure auf pH 6 eingestellt und die Lösung zur Entfernung der Natriumionen über eine Säule von Amberlite IR 120 gegeben. Das Eluat wurde im Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Zur Entfernung der Borsäure wurde mehrmals mit trockenem Methanol abgezogen (96). Der Rückstand wurde in 0,1 ml Wasser aufgenommen, mit 0,1 ml 0,2 N HCl versetzt und zur Hydrolyse 5 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt.

Die Bestandteile der mit Borhydrid behandelten Verbindungen wurden durch Dünnschichtchromatographie des Hydrolysats identifiziert.

Im Hydrolysat von Desoxyrohrzucker erfolgte außerdem die quantitative Bestimmung der Monosaccharidbestandteile, in dem von Verbindung C_1 die fermentative Prüfung auf Glucose.

Da nach diesem Vorgehen bei Desoxyrohrzucker ein Substanzverlust von etwa 20% aufgetreten war, wurde von Verbindung C_1 und B_1 eine zweite Probe wie oben reduziert, unmittelbar danach hydrolysiert und die Desoxyglucose ohne Entfernung der Borsäure mit der Thiobarbitursäuremethode gemessen. Die Vergleichslösung wurde mit einer entsprechenden Menge Borsäure versetzt, da diese die Meßergebnisse um etwa 7% verringert.

Abbau durch Perjodat

(1) Bestimmung des Perjodatverbrauchs

Die Bestimmung erfolgte nach der spektrophotometrischen Methode von ASPINALL und FERRIER (91), die das Absorptionsmaximum des Perjodations bei λ = 222,5 mμ benutzt. Der durch die Absorption des entstehenden Jodations verursachte Fehler von ca 16 % wird durch einen experimentell ermittelten Korrekturfaktor eliminiert. In Abweichung von der Vorschrift wurden die Ansätze auf 1/10 des Volumens reduziert. Dem Perjodatgehalt von 15 μMol/Ansatz

entsprechend wurde die einsetzbare Saccharidmenge (µMol) nach der Formel µMol·P = 7 bis 10 berechnet, wobei P dem mutmaßlichen Verbrauch von Perjodat pro Mol Substanz entspricht.

Lösungen: 0,015 M $NaJO_4$ (Konzentration mittels Arsenitlösung jodometrisch bestimmt), 0,015 M $NaJO_3$.

Ausführung: Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Ausschluß von Tageslicht durchgeführt. Folgende Lösungsgemische

a) 0,1 ml Untersuchungslösung + 1 ml Perjodat-Lsg.
b) 0,1 ml Wasser + 1 ml Perjodat-Lsg.
c) 0,1 ml Wasser + 1 ml Jodat-Lsg.

wurden jeweils dreifach angesetzt und in verschlossenen Schliffreagensgläsern bei 20 - 21° im Dunkeln belassen. Nach entsprechenden Zeiten wurden aus sämtlichen Ansätzen je 0,1 ml entnommen und mit dest. Wasser 250fach verdünnt.

Messung der verdünnten Lösungen gegen Wasser bei $\lambda = 223$ mµ, d = 1 cm.

Berechnung:

$$\frac{E_b - E_a + (E_b - E_a) \cdot F}{E_b} \cdot 15 = \mu\text{Mol Perjodat},$$

verbraucht für die im Ansatz vorhandene Substanzmenge; F = Korrekturfaktor für die Absorption des entstandenen Jodats, berechnet aus E_c/E_b.

(2) Messung von Formaldehyd

Zur Messung des bei der Perjodatoxydation entstandenen Formaldehyds wurde die Chromotropsäuremethode (92, 93) den vorliegenden Erfordernissen entsprechend modifiziert. Um eine Hydrolyse der säurelabilen 2-Desoxy-hexoside zu vermeiden wurde beim pH des Natriumperjodats oxydiert. Die eingesetzte Kohlenhydratmenge wurde so bemessen, daß die daraus gebildete Formaldehydmenge 15 γ nicht überschritt (vgl.l.c. 92).

Lösungen: 0,1 M $NaJO_4$, 10proz. Natriumhydrogensulfitlösung (9,13 g Natriumpyrosulfit ad 100 ml), Chromotropsäurereagens (1 g Chromotropsäure mit Wasser ad 100 ml, mit 450 ml ca 12 M H_2SO_4 [D = 1,624] versetzt), halbgesätt. Thioharnstofflösung, Vergleichslösung von Erythrit (22,33γ/0,5 ml, entsprechend 10 γ Formaldehyd).

Ausführung: Sämtliche Arbeitsgänge unter Ausschluß von Tageslicht. 0,5 ml Untersuchungslösung und 0,5 ml Perjodat in verschlossenen Reagensgläsern bei Zimmertemp. im Dunkeln. Nach entsprechenden Zeiten Unterbrechung der Oxydation durch 0,5 ml Bisulfitlösung. Zugabe von 10 ml Chromotropsäurereagens, nach gutem Durchmischen 30 Min. im sied. Wasserbad im Dunkeln. Nach Abkühlen 1 ml Thioharnstoff zur Entfärbung des Leerwertes.

Messung gegen Leerwert bei λ = 570 mμ, d = 1 cm.

2-Desoxy-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin ist die Formaldehydbildung nach 2-ständiger Oxydation vollständig. Die durch die Perjodatoxydation notwendigen Reagentien sowie Thioharnstoff beeinflussen den Farbcharakter des Kopplungsproduktes nicht, da dieses die von McCADYEN (92) beschriebenen charakteristischen 3 Absorptionsmaxima bei λ = 569, 479 und 382 mμ aufweist. Für den aus Erythrit freigesetzten Formaldehyd wurde ϵ_{570} zu 0,538 bis 0,554 [cm^2/γ] bestimmt, Literaturwerte für nicht durch Perjodatoxydation entstandenen Formaldehyd: 0,546 bis 0,571 (92).

(3) Messung von Malonaldehyd

Die Entstehung von Malonaldehyd aus an C-3 und C-4 nicht substituierten 2-Desoxy-zuckern bei Perjodatoxydation wurde benutzt, um in 2-Desoxy-hexosiden den Furanosering auszuschließen und bei 2,2'-Didesoxy-glucobiosen Anhaltspunkte für den Bindungstyp zu gewinnen.

Die Bestimmung des Malonaldehyds erfolgte mittels Thiobarbitursäure wie bei Messung der 2-Desoxy-hexosen angegeben (S.100).

Oxydiert wurden die nicht hydrolysierten Saccharide, wobei gegebenenfalls die Oxydationsbedingungen variiert wurden. Die hydrolytische Freisetzung des entstandenen, aber noch als Acetal gebundenen Malonaldehyds erfolgte direkt im Ansatz zur Kopplung mit Thiobarbitursäure (pH 1,7, 85°, 25 Min.). Die Vollständigkeit der Freisetzung wurde durch den für O-Methyl-2-desoxy-α-D-glucopyranosid[+] gefundenen theoretischen Malonaldehydwert (± 3%) bewiesen.

a) Verbindung B_1 (2,2'-Didesoxy-glucobiose) wurde unter unveränderten Bedingungen oxydiert. Der gefundene Malonaldehydwert von 1,38 Mol/Mol Disaccharid ließ eine partielle Hydrolyse während der Oxydation (pH 2, 40°, 60 Min.) vermuten. Verkürzung der Reaktionszeit auf 30 Min., wonach die Oxydation der als Vergleichssubstanz verwendeten 2-Desoxy-glucose bereits vollständig ist, ergab dementsprechend 1,18 Mol/Mol.

b) Verbindung B_2 (2-Desoxy-D-galaktopyranosyl-(1→1)-glycerin) wurde gleichfalls in saurer Perjodatlösung 2 Std. oxydiert, wobei jedoch aufgrund der rascheren Oxydation von 2-Desoxy-galaktose die Temperatur auf 20° gesenkt und die Reaktionszeit auf 15 Min. verkürzt werden konnte (vgl. Abb. 17 S.63). Daß im Vergleichsansatz

---

+) Darstellung nach HUGHES u. Mitarb. (41). [α], +134° (c=1,36%, Wasser), Schmp. 89 - 91°, Literaturwerte: $[\alpha]_D$ +135° (c=0,67%, Wasser), Schmp. 90 - 92°.

ohne Perjodsäure unter sonst gleichen Bedingungen nach fermentativer Messung kein Glycerin nachweisbar ist, beweist, daß das Saccharid unhydrolysiert bleibt. Gefunden: 1,05 Mol Malonaldehyd/Mol B_3, gemessen gegen 2-Desoxy-galaktose als Vergleichssubstanz.

c) Desoxyrohrzucker wurde wegen seiner besonderen Säurelabilität beim pH von Natriummetaperjodat (0,02M) oxydiert, wobei um Fehler durch etwaige Überoxydation zu eliminieren, O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid+) als Vergleichssubstanz eingesetzt wurde. Um die Kopplungsbedingungen nicht zu verändern, wurde die Arsenitlösung mit Schwefelsäure versetzt (0,66mÄq/10 ml). Pro Mol Desoxyrohrzucker gefunden: nach 1,5 Stdn. Oxydation 0,97 Mol Malonaldehyd, nach 3 Stdn. 0,96 Mol.

(4) Perjodatoxydation mit anschließender $NaBH_4$-Reduktion

Das Verfahren, das zur Strukturaufklärung von 2'-Desoxymaltose Verwendung fand (S.44), wurde im wesentlichen nach der Vorschrift von KUHN (94) durchgeführt. Die Perjodatoxydation erfolgt hier bei pH 4,6 und 6°, um eine Verseifung des an der endständigen Glucose entstehenden Formylesters zu vermeiden.

3,1 µMol der Verbindung C_1 (in 0,1 ml Wasser) wurden unter Eiskühlung mit 0,3 ml 0,5 M Acetatpuffer pH 4,6 und 0,6 ml 0,25 M $NaJO_4$-Lsg. (210 µMol) versetzt und bei 6° 12 Stdn. im Dunkeln belassen. Anschließend wurde das überschüssige Perjodat durch 1 Tr. Glykol zerstört und das Reaktionsgemisch zur Entsalzung über Amberlite IR 120/IR 45 gegeben. Das Eluat wurde bei 20° im Vak. auf ca. 5 ml eingeengt und anschließend gefriergetrocknet. Der in 0,2 ml Wasser aufgenommene Rückstand wurde im Eisbad mit 5 mg Natriumborhydrid (132 µMol) versetzt, 12 Stdn. bei Zimmertemp. belassen, dann mit 2 N Essigsäure auf pH 6 gebracht, über Amberlite IR 120 gegeben und durch mehrmaliges Abziehen mit getrocknetem Methanol von Borsäure befreit. Der Rückstand wurde in 0,15 ml Wasser aufgenommen und mit 0,1 ml 0,2 N H_2SO_4 3 Stdn. bei 85° hydrolysiert. Die Schwefelsäure wurde mit Bariumhydroxyd entfernt und die so gewonnene Lösung zur Dünnschichtchromatographie in System 3 verwendet. Mit Silbernitrat nachweisbar: Glycerin und Erythrit, die sowohl untereinander als auch gegen Pentite und Hexite völlig getrennt erscheinen (vgl. Abb. 16 S.61). Die gleichen Produkte waren auch nach analoger Behandlung der als Vergleichssubstanz untersuchten Maltose nachweisbar. Bei Dünnschichtchromatographie in System 1 wurde keine 2-Desoxy-aldose gefunden.

+) Vgl. Fußnote S.107

Bestimmung der spezifischen Drehung

Das optische Drehungsvermögen der verschiedenen Verbindungen wurde in wäßr. Lösung im 10cm Mikrorohr mit dem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter (0,005°) der Fa. Zeiss bei λ = 578 und 546 mμ bestimmt und aus beiden Werten nach einer dem Apparat beigegebenen Formel α_{589} berechnet:

$$\alpha_{589} = \frac{\frac{\alpha_{578}}{\alpha_{546} - \alpha_{578}}}{\frac{\alpha_{578}}{\alpha_{546} - \alpha_{578}} + 1{,}3727} \cdot \alpha_{546}$$

Zur Messung eingesetzt wurden die bei -20° aufbewahrten "Ausgangslösungen", die auch zur quantitativen Bestimmung der Bestandteile und zur Strukturaufklärung verwendet wurden. Der Berechnung von $[\alpha]_D$ konnten daher die in den Hydrolysaten ermittelten extremen Konzentrationen der Saccharidbestandteile zugrundegelegt werden (Tab.19).

Fermentative Spaltungen

(1) Desoxyrohrzucker

0,05 ml Saccharidlösung (1 μMol) wurden mit 10 γ Invertase (melibiase-free, analyt., Nutritional Biochemicals Corporation) und 0,05 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 4,7 bei 20° inkubiert und die Spaltung dünnschichtchromatographisch verfolgt (System 1). Das Disaccharid erfährt in Acetatpuffer ohne Fermentzusatz keine Spaltung. Die Spaltungsgeschwindigkeit von Rohrzucker wurde in äquimolarer Lösung polarimetrisch ermittelt.

Das Enzympräparat spaltet Melizitose nicht (Glucosemessung im UV-Test) und ist daher frei von α-Glucosidase-Aktivität. 2'-Desoxy-maltose und O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid[+]) werden unter gleichen Bedingungen nicht gespalten (dünnschichtchromatographisch geprüft).

(2) 2'-Desoxy-maltose

0,1 ml Saccharidlösung (2 μMol) wurden mit 0,1 ml 1proz. Maltaselösung (Nutritional Biochemicals Corporation) in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 bei 37° inkubiert. Zu gegebenen Zeiten wurde dünnschichtchromatographisch (System 1) auf freigesetzte 2-Desoxyglucose geprüft. Im gleichen Ansatz wurden äquimolare Mengen Maltose innerhalb von 30 Min. vollständig gespalten.

[+]) vgl. Fußnote S.107

Tabelle 19: Zur Berechnung der spezifischen Drehungen

Verbindung	α_{589}	Bestandteile (µMol/ml)	Saccharid (g/100ml)	$[\alpha]_D^{20}$
Desoxyrohrzucker				
Präparat I	+0,524°	21,36 - 22,64	0,706 - 0,738	+ 43,9 bis + 45,9°
Präparat II	+4,407°	295,29 -307,90	9,659 -10.037	+ 43,9 bis + 45,6°
Verbindung C_1				
Präparat I	+0,658°	20,30 - 21,05	0,662 - 0,685	+125,1 bis +129,6°
Präparat II	+0,401°	8,74 - 9,12	0,285 - 0,297	+135,1 bis +140,8°
Verbindung B_1	+0,124°	9,50 - 9,91	0,102 - 0,104	+115,9 bis +121,6°
Verbindung B_3	-0,177°	39,58 - 56,08	0,847 - 0,858	- 20,6 bis - 20,9°

Molekulargewichte zur Umrechnung von µMol/ml in g/100ml: Desoxyrohrzucker und Verbindung C_1: 326, Verbindung B_1: 510, Verbindung B_3: 838. Bei Verbindung B_1 ist für die Umrechnung die halbe Konzentration des Präparates einzusetzen, da es sich um eine 2,2'-Didesoxy-glucobiose handelt und somit zwei Bestandteile bei der Messung erfaßt werden.

RAYBINsche Probe

(a) in Lösung (38):

1 mg 5-Diazouracil, 0,4 ml 1proz. Zuckerlösung und 0,1 ml 0,25 N NaOH wurden bei 10° bis zur Lösung des Diazouracils gemischt.

Bei Rohrzucker, Raffinose und 2-Desoxy-rohrzucker (Präparat II) färbte sich die Lösung in wenigen Minuten blaugrün. Nach Zugabe von 5 Tr. 4proz. $MgCl_2$-Lsg. blauer Niederschlag.

Bei 2-Desoxy-glucose, Fructose, einem Gemisch beider Zucker, O-Methyl-2-desoxy-α-*D*-glucopyranosid+), Melizitose und α,α-Trehalose waren Lösung und Niederschlag gelblich bis rotbraun gefärbt.

(b) im Tüpfeltest (nach l.c.95)

1 µl einer mindestens 10proz. Zuckerlösung wurde auf Chromatographiepapier angetrocknet, mit eben bereiteter alkalischer Diazouracillösung (30mg/10ml 0,1N NaOH) besprüht und 5 - 10 Min. bei 60° belassen.

Rohrzucker, Raffinose und 2-Desoxy-rohrzucker (Präparat I und II) erscheinen blau, die übrigen oben genannten Zucker rötlichbraun.

+) s. Fußnote S.107

Literaturverzeichnis

1) E. Fischer, M. Bergmann u. H. Schotte, Ber. dtsch. chem. Ges. 53, 509 [1920]

2) M. Bergmann, H. Schotte u. W. Lechinsky, ebenda 55, 158 [1922]

3) A. Sols u. R. K. Crane, J. biol. Chemistry 210, 581 [1954]

4) D. M. Kipnis u. C. F. Cori, ebenda 234, 171 [1959]

5) A. Sols, R. de la Fuente, C. Villar-Palasi u. C. Asensio, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 30, 92 [1958]

6) F. Alvarado, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 41, 233 [1960]

7) A.N. Wick, D.R. Drury, H.I. Nakada u. J.B. Wolfe, J. biol. Chemistry 224, 963 [1957]

8) L. Kiesow, Z. Naturforsch. 14b, 492 [1959]

9) G. Weidemann u. W. Fischer, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 336, 189 [1964]

10) G. Weidemann u. W. Fischer, ebenda 336, 192 [1964]

11) W. Fischer u. H. Weinland: Stoffwechsel der Galaktose und ihrer Derivate, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1965 a) S.71, b) S.107, c) S.110, d) S.52ff, e) S.6, f)S.106ff

12) W. Fischer u. G. Weidemann, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 336, 195 [1964]

13) W. Fischer u. G. Weidemann, ebenda 336, 206 [1964]

14) W. Fischer u. G. Weidemann, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 93, 677 [1964]

15) J. Kocourek, M. Tichá, V. Jiráček u. J. Koštíř, ebenda 71, 497 [1963]

16) M. Tichá, persönliche Mitteilung

17) J. Krieglstein, unveröffentlichte Ergebnisse

18) F. Kollmann, Dissertation, in Vorbereitung

19) W. Fischer, unveröffentlichte Ergebnisse

20) P. Biely u. Š. Bauer, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 121, 213 [1966]

21) K. Wallenfels u. G. Kurz, Biochem. Z. 335, 559 [1961/62]

22) A.L. Cline u. A.S.L. Hu, J. biol. Chemistry 240, 4493 [1965]

23) G. Avigad, D. Amaral, C. Asensio u. B.L. Horecker, ebenda 237, 2736 [1962]

24) R.B. McComb, W.D. Yushak u. W.G. Batt, J. Franklin Inst. 263, 161 [1957]

25) A. Sols u. G. de la Fuente, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 24, 206 [1957]

26) M. Tichá, J. Kocourek, V. Jiráček u. J. Koštíř, Experientia 19, 416 [1963]

27) R.C. Bean, G.G. Porter u. B.M. Steinberg, J. biol. Chemistry 236, 1235 [1961]

28) W. Fischer u. G. Weidemann, in Vorbereitung

29) L.F. Leloir, Biochem. J. 91, 1 [1964]

30) C.E. Cardini, L.F. Leloir u. J. Chiriboga, J. biol. Chemistry 214, 149 [1955]; L.F. Leloir u. C.E. Cardini, ebenda 214, 157 [1955]; J. Mendicino, ebenda 235, 3347 [1960]

31) E.J. Bourne, J.B. Pridham u. M.W. Walter, Biochem. J. 82, 44 P [1962]; E.J. Bourne, M.W. Walter u. J.B. Pridham, ebenda 97, 802 [1965]; J.B. Pridham u. W.Z. Hassid, Plant Physiol. 40, 984 [1965]

32) G.A. Barber, J. Amer. chem. Soc. 81, 3722 [1959]

33) Z. Selinger u. M. Schramm, J. biol. Chemistry 236, 2183 [1961]

34) G. Weidemann u. W. Fischer, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 342, 238 [1965]

35) W. Fischer u. G. Weidemann, ebenda 346, 171 [1966]

36) C.B. Purves u. C.S. Hudson, J. Amer. chem. Soc. 56, 708 [1934]

37) M. Adams, N.K. Richtmyer u. C.S. Hudson, ebenda 65, 1369 [1943]; K. Myrbäck in P.D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes, Bd.4, S.379, Academic Press New York London 1960

38) H.W. Raybin, J. Amer. chem. Soc. 55, 2603 [1933]; ebenda 59, 1402 [1937]

39) W.Z. Hassid, N. Doudoroff, H.A. Barker u. W.H. Dore, ebenda 68, 1465 [1946]

40) J.M. Bobbitt, Advances in Carbohydrate Chem. 11,1 [1956]

41) R.J. Ferrier u. W.G. Overend, J. chem. Soc. [London] 1959, 3638

42) T.G. Halsall, E.L. Hirst u. J.K.N. Jones, ebenda 1947, 1427; G. Neumüller u. E. Vasseur, Ark. Kem. 5, 235 [1953]

43) W. Fischer u. J. Krieglstein, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 344, 113 [1966]

44) J.F. O'Dea u. R.A. Gibbons, Biochem. J. 55, 580 [1953]

45) J. Staněk, Nature [London] 179, 97 [1957]

46) J.S.D. Bacon u. D.J. Bell, J. chem. Soc. [London] 1957, 3581

47) W.G. Overend, M. Stacey u. J. Staněk, ebenda 1949, 2841

48) I.W. Hughes, W.G. Overend u. M. Stacey, ebenda 1949, 2846

49) W.G. Overend, F. Shafizadeh u. M. Stacey, ebenda, 1950, 671

50) W.G. Overend u. M. Stacey, J. Sci. Food Agriculture 1, 168 [1950]

51) B. Helferich u. A. Iloff, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 221, 252 [1933]

52) R.W. Bailey: Oligosaccharides, Pergamon Press New York London 1965

53) R.E. Reeves, N.G. Latour u. R.J. Lousteau, Biochemistry 3, 1248 [1964]

54) B. Wickberg, Acta chem. scand. 12, 1183, 1187 [1958]

55) L.G. Egüd u. W.J. Whelan, Biochem. J. 86, 11 P [1963]

56) J. Edelman, ebenda 57, 22 [1954]

57) W.Z. Hassid u. M. Doudoroff, Advances in Enzymol. 10, 123 [1950], Advances in Carbohydrate Chem. 5, 29 [1950]

58) W.Z. Hassid in W.D. McElroy u. B. Glass: Phosphorus Metabolism, Bd.1, S.11, The John Hopkins Press, Baltimore 1951

59) O. Kandler, Ber. dtsch. botan. Ges. 77, 62 [1964]; vgl. K. Jeremias u. U. Kull, Experientia 22, 141 [1966]

60) L.F. Leloir, M.A. Rongine u. E.C. Cardini, J. biol. Chemistry 236, 636 [1961]; E. Recondo u. L.F. Leloir, Biochem. biophysic. Res. Commun. 2, 85 [1961]; R.B. Frydman, Arch. Biochem. Biophysics, 102, 242 [1963]

61) R.B. Frydman u. C.E. Cardini, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 96, 294 [1965]

62) B. Wickberg, Acta chem. scand. 11, 506 [1957]

63) H.E. Carter, R.M. McCluer u. E.D. Slifer, J. Amer. chem. Soc. 78, 3735 [1956], H.E. Carter, K. Ohno, S. Nojima, C.L. Tipton u. N.Z. Stanacev, J. Lipid Research 2, 215 [1961]; H.E. Carter, R.A. Hendry u. N.Z. Stanacev, ebenda 2, 223 [1961]

64) J.H. Law, Ann. Rev. Biochem. 29, 131 [1960], L.P. Zill u. G.M. Cheniae, Ann. Rev. Plant Physiol. 13, 225 [1962]; P.S. Sastry u. M. Kates, Biochemistry 3, 1288 [1964]

65) A.A. Benson, J.F.G.M. Wintermans u. R. Wiser, Plant Physiol. 34, 315 [1959]; J.F.G.M. Wintermans, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 44, 49 [1960]; L.P. Zill u. E.A. Harmon, ebenda 57, 573 [1962]

66) M. Kates, ebenda 41, 315 [1960]; R.O. Weenik, J. Sci. Food Agriculture 12, 34 [1961]; F.T. Wolf, J.G. Coniglio u. J.T. Davis, Plant Physiol. 37, 83 [1962]; P.S. Sastry u. M. Kates, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 70, 214 [1963]

67) A.A. Benson, Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 1 [1964]

68) R.A. Ferrari u. A.A. Benson, Arch. Biochem. Biophysics 93, 185 [1961]

69) E.F. Neufeld, Fed. Proc. 22, 464 [1963]; E.F. Neufeld u. C.W. Hall, Biochem. biophysic. Res. Commun. 14, 503 [1964]

70) P.S. Sastry u. M. Kates, Biochemistry 3, 1280 [1964]

71) J. Krieglstein u. W. Fischer, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 344, 209 [1966]

72) J. Krieglstein, Dissertation, in Vorbereitung

73) A. Gottschalk in J.B. Sumner u. K. Myrbäck: The Enzymes, 1st edit., Bd.1, Teil 1, S. 551, Academic Press New York 1950

74) E.G. Bligh u. W.J. Dyer, Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 911 [1959]

75) R.L. Whistler u. D.F. Durso, J. Amer. chem. Soc. 72, 677 [1950]; W.J. Whelan, J.M. Bailey u. P.J.P. Roberts, J. chem. Soc. [London] 1953, 1293

76) P. Godin, Nature [London] 174, 134 [1954]; A.P. McLennan, H.M. Randall u. D.W. Smith, Analytic. Chem. 31, 2020 [1959]

77) I.L. Bryson u. T.I. Mitchell, Nature [London] 167, 864 [1951]; G. Harris u. I.C. McWilliam, Chemistry and Industry 1954, 249

78) D.J. Bell u. D.H. Northcote, ebenda 1954, 1328; C.S. Wise, R.J. Dimmler, H.A. Davis u. C.E. Rist, Analytic. Chemistry 27, 33 [1955]

79) A. Jeanes, C.S. Wise u. R.J. Dimmler, ebenda 23, 415 [1951]

80) F. Weygand u. H. Hofmann, Chem. Ber. 83, 405 [1950]

81) W.E. Trevelyan, D.P. Procter u. J.S. Harrison, Nature [London] 166, 444 [1950]; G.H. Schmidt u. H. Brunnert, J. Chromatogr. [Amsterdam] 10, 190 [1963]

82) A. Schweiger, ebenda 9, 374 [1962]

83) M.M.L. Velluz, M. Pesez u. G. Amiard, Bull. Soc. chim. France 1948, 680

84) E. Stahl: Dünnschichtchromatographie, S.513, Springer Verlag Heidelberg 1962

85) E. Stahl u. U. Kaltenbach, J. Chromatogr. [Amsterdam] 5, 351 [1961]

86) B.L. Horecker u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 175, 385 [1948]

87) H.W. Augustin u. E. Hofmann, Acta biol. med. german. 11, 628 [1963]; vgl. V.S. Waravdekar u. L.D. Saslaw, J. biol. Chemistry 234, 1945 [1959]

88) W. Fischer u. J. Zapf, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 337, 186 [1964]

89) S.M. Partridge, Nature [London] 164, 443 [1949]; B. Mittendorf, Dissert., Erlangen,

90) O. Wieland, Biochem. Z. 329, 313 [1957]; O. Wieland in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, S.211, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962

91) G.O. Aspinall u. R.J. Ferrier, Chemistry and Industry 1957, 1216

92) D.A. McFadyen, J. biol. Chemistry 158, 107 [1945]

93) D.J. Hanahan u. J.N. Olley, ebenda 231, 813 [1958]

94) R. Kuhn u. H. Wiegand, Chem. Ber. 96, 866 [1963]

95) H.J. Breuer u. J.S.D. Bacon, Biochem. J. 66, 462 [1957]

96) L.P. Zill, J.X. Khym u. G.M. Cheniae, J. Amer. chem. Soc. 75, 1339 [1953]

97) M.L. Wolfrom u. A. Thompson in R.L. Whistler u. M.L. Wolfrom: Methods in Carbohydrate Chemistry, Bd.2, S.67, Academic Press New York London 1963

98) M.L. Wolfrom, M. Konigsberg, F.B. Moody u. R.M. Goepp, jr., J. Amer. chem. Soc. 68, 124 [1946]

99) Z. Kowalewski, O. Schindler, H. Jäger u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta 43, 1280 [1960]

100) Z. Kowalewski, O. Schindler u. T. Reichstein, ebenda 43, 1214 [1960]

101) Z. Dische u. E. Borenfreund, J. biol. Chemistry 192, 583 [1951]

102) P.J. Allen u. J.S.D. Bacon, Biochem. J. 63, 200 [1956]

BUCH- UND FOTODRUCK
LUDWIG MÖLLER
ERLANGEN · FAHRSTR. 5